

## 目次

<b>第1章 緒言</b> .....	3
第1節 コエンザイム Q.....	4
第1項 構造.....	4
第2項 役割.....	5
2-1 ATP 産生におけるミトコンドリアでの電子輸送.....	5
2-2 抗酸化能.....	5
第3項 CoQ の生合成.....	6
第4項 CoQ 合成酵素の欠損による症例.....	7
第5項 治療における CoQ 投与の事例.....	7
5-1 パーキンソン病(PD).....	7
5-2 アルツハイマー型認知症(AD).....	8
5-3 ハンチントン病(HD).....	8
5-4 多系統萎縮症(MSA).....	8
第6項 CoQ の吸収と輸送.....	9
第2節 コレステロール.....	10
第3節 ミトコンドリアについて.....	10
第1項 構造.....	10
第2項 機能.....	11
2-1 ATP 産生.....	11
2-2 ステロイドホルモンの合成.....	11
第4節 神経細胞培養におけるサプリメント含有物.....	12
第1項 トランスフェリン.....	12
第2項 インスリン.....	12
第3項 プロゲステロン.....	13
第5節 目的.....	14
<b>第2章 細胞内 CoQ 量は、神経細胞の分化に伴い増加し、神経突起の伸長に重要である</b> .....	15
第1節 概要.....	15
第2節 方法.....	16
第1項 細胞培養.....	16
第2項 ミトコンドリアの単離.....	16
第3項 神経突起長の測定.....	16
第4項 脂質測定.....	17

第5項	CoQ低下細胞モデルの作成	17
第6項	RNA測定	18
第7項	統計解析	18
第3節	結果	19
第1項	神経細胞の分化によるCoQ量	19
第2項	CoQ合成酵素遺伝子の発現量	23
第3項	CoQ量低下細胞モデルの神経突起長測定	25
第4節	考察	27
第3章	トランスフェリン・インスリン・プロゲステロンは、未分化のPC12細胞において、CoQおよびFCの細胞内濃度を調節する	30
第1節	緒言	30
第2節	方法	32
第1項	細胞培養	32
第2項	神経突起長測定	32
第3項	脂質測定	32
第4項	RNA測定	32
第5項	CoQ量低下細胞モデルの樹立	33
第6項	統計解析	33
第3節	結果	34
第1項	メバロン酸経路へのTIPの影響	34
第2項	細胞内CoQ量増加因子の探索	38
第3項	細胞内FC量減少因子の探索	41
第4項	細胞内CoQ量増加因子の探索とCoQ合成酵素の遺伝子発現量	44
第5項	CoQ量低下細胞モデルへのTIP投与	45
第4節	考察	46
第4章	結語	49
	参考文献	51
	業績	62
	謝辞	63

## 第1章 緒言

厚生労働省の患者調査<sup>(1)</sup>によると、平成8年の神経系の疾患の患者割合は、推計外来患者総数の1.6%、推計入院患者総数の4.5%であった。精神及び行動の障害に分類された患者の割合は、推計入院患者総数の1.1%であり、推計外来患者総数の1.8%であった。対して、令和2年の神経系の疾患の患者割合は、推計外来患者総数の2.3%、推定入院患者総数の10.4%となっており、精神及び行動の障害に分類された患者の割合は、推計入院患者総数の19.5%であり、推計外来患者総数の3.7%である。日本社会において、これらの割合に占める患者の割合はこれからも増加していくことが予想される。

脳および神経系は、呼吸などの生命維持活動から、歩行や食事などの運動、思考や会話、感情の発露、記憶などの複雑な認知行動なども担う器官である。したがって、これら脳神経系の疾病は多彩な症候を示す。例えば、記憶力、判断力、遂行力、人格などが障害されてしまう認知症や、急性の脳卒中から徐々に進行する血管性認知症まで広汎な病態を有する脳血管障害、動きが鈍くなってしまうパーキンソン病、大脳ニューロンの過剰な発火により反復性の発作を起こすてんかん、呼吸筋も含め全身の筋力低下・筋萎縮が進むALS（筋萎縮性側索硬化症）、筋ジストロフィー、脳の癌を含む脳腫瘍などである。悲しみと無関心が数週間、数か月、場合によっては数年続くことが特徴のうつ病も、発症患者の成人の脳の構造および機能の違いが発見されている<sup>(2,3)</sup>。これらの脳神経疾患や、筋疾患は難治性で、現在においてもいまだ本質的治療法のない疾患が多く残されている。

生物が生命活動を行うためには、常にエネルギーを獲得しなければならない。このエネルギーは、体温維持や、筋収縮・細胞膜透過、物質の生合成、神経活動などの生命維持活動に利用される。このエネルギー供給物質として、我々地球上の生命はアデノシン三リン酸(ATP)を利用する。我々は通常、生命活動を行うために必要なエネルギーを主として糖質から獲得しており、中でもグルコースが燃料分子として最も重要である。特に、脳は通常の状態ではグルコースを唯一の燃料分子としており、低血糖は脳に大きな障害をもたらす、最悪死に至らしめる。

ATPの合成には、酸素を必要としない嫌氣的な呼吸と、酸素が必要な好気呼吸がある。好気呼吸はミトコンドリアで行われ、グルコースをCO<sub>2</sub>とH<sub>2</sub>Oにまで完全に酸化させることで大量のATPを産生する。ATPの産生にあたり、非常に重要な役割を果たす物質の一つがコエンザイムQ(CoQ)である。

ニューロンは、神経シグナルの伝達と急速な伝播を可能にする原形質膜のイオン勾配を維持するために、大量のATPを必要とする。イオン輸送プロセス、すなわちNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase およびCa<sup>2+</sup>-ATPaseは、中枢神経系(CNS)で消費されるATPの約60~80%を消費して、ニューロンの興奮性を可能にするイオン勾配を維持する<sup>(4)</sup>。つまり、CNSは酸化的リン酸化によるATPの生成をサポートするために、ミトコンドリア機能と酸素供給に決定的に依存する莫大なエネルギー需要を持っている。

言い換えれば、CoQがなければ好氣的な呼吸が行われず、ATPの産生に支障をきたし、

このために生命活動を行うためのATPが少なくなり、神経系に支障をきたすため、健康を損なうと考えられる。

そこで本研究では神経細胞と CoQ の関係に着目した。本章では、第 1 節 CoQ について、第 2 節にコレステロールについて、第 3 節でミトコンドリアについて、第 4 節で神経系との関連が注目される 3 つの物質(トランスフェリン、インスリン、プロゲステロン)について概説するとともに、第 5 節で本論文における目的を記す。

## 第 1 節 コエンザイム Q

### 第 1 項 構造

コエンザイム Q (CoQ) は 1958 年にその化学構造が決定された<sup>(5)</sup>。1955 年に Morton らは動物臓器アルカリ処理し、分解されなかった不けん化物から石油エーテルで抽出される化合物 A について報告した<sup>(6)</sup>。1957 年には、Crane らによってウシ心臓のミトコンドリアから単離された化合物がキノン体であると推定された<sup>(7)</sup>。決定されたキノン体の構造の名称を、Morton らは、“ユビキノン”と命名し<sup>(8)</sup>、Crane らは“コエンザイム Q”と命名した。

CoQ の化学構造は図 1 に示した通り、酸化型と還元型の 2 種類が存在する。酸化型はユビキノンとも呼ばれ、オレンジ色の粉末である。酸化型の特徴はベンゼン環に酸素が 2 個付いたベンゾキノン構造である。ベンゾキノン構造を 1 電子還元するとセミキノン構造になり、ベンゾキノンが 2 電子還元されヒドロキノン構造となる。これが還元型の CoQ であり、ユビキノールとも呼ばれる。これは無色の粉末である。

CoQ には、側鎖のイソプレン単位の違う多数の同族体が存在し<sup>(9-13)</sup>、例えば、酵母ではイソプレン単位が 6、大腸菌では 8、ラットやマウスでは 9、ヒトでは 10 である。また、メダカでは 10、ピーマンでは 11、レジオネラ菌では 12 などから、進化とともにイソプレンの単位が長くなっているわけではないと考えられている。

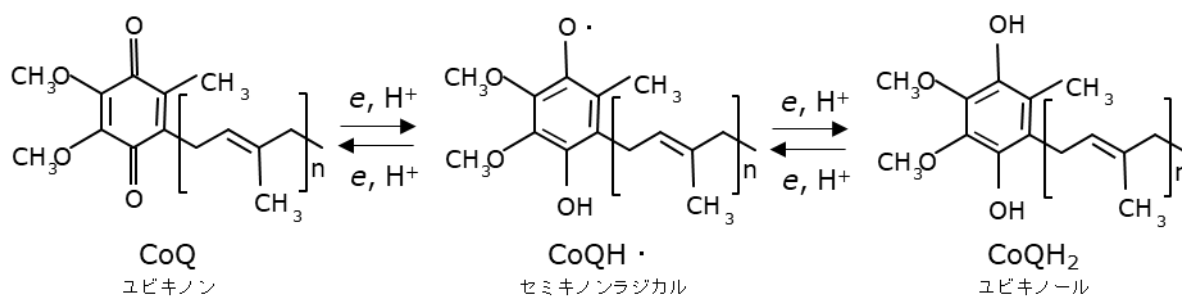


図 1 CoQ の構造

## 第2項 役割

CoQ には大きく2つの役割がある。1つは ATP の産生にかかわる電子の輸送であり、もう一つは抗酸化物質としての役割である。

### 2-1 ATP 産生におけるミトコンドリアでの電子輸送

好気呼吸の最終ステップである電子伝達系で、電子を伝達するために CoQ が必要である。

CoQ はタンパク質に結合していない電子キャリアであり、脂質であることから、ミトコンドリア内膜の疎水性内部に溶け込んで自由に動き回ることができる。ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I および複合体 II から2個の電子と、2個のプロトンを受け取り CoQH<sub>2</sub> となり、複合体 III へ電子を2個受け渡す<sup>(14)</sup>。この過程はプロトン駆動性 Q サイクル<sup>(15)</sup>とも呼ばれる。ミトコンドリア呼吸鎖複合体はそれぞれ独立しているのではなく、さらにそれらが複合体(超複合体, supercomplexes)を形成していることが実証され<sup>(16)</sup>、CoQ はその超複合体中に含まれていることが報告されている<sup>(17)</sup>。

### 2-2 抗酸化能

CoQ が抗酸化能を示すのは還元型のほうである。1980年に還元型 CoQ に抗酸化能があることが明らかにされた<sup>(18)</sup>。この報告では、ウシ心臓のミトコンドリア粒子を酸化し、脂質過酸化の進行過程と、ユビキノンの還元状態が逆相関することを認めた。1982年には *in vivo* でも抗酸化作用を示すことが報告された<sup>(19)</sup>。ラット肝臓の虚血再灌流に伴うミトコンドリア機能低下、ATP 合成能の低下、脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド増加が、酸化型 CoQ<sub>10</sub> の前処理により抑制され、さらに生存率が向上した。虚血再灌流に伴い減少するのは還元型 CoQ のほうである。投与した酸化型 CoQ は肝臓に移行し、一部還元され、還元型 CoQ として存在していたことから、還元型 CoQ が虚血再灌流障害を抑制したと考えられた<sup>(20)</sup>。

Niki らのグループなどで行われた、アゾ化合物をラジカル開始剤とした生体膜モデルを用いた実験では、リポソーム内では酸化型 CoQ には抗酸化能がないことを確認し、還元型 CoQ はビタミン E と同等の抗酸化能を示すことを報告した<sup>(21)</sup>。還元型はフリーラジカルを消去する重要な抗酸化物質である<sup>(22, 23)</sup>。

血漿中の酸化型 CoQ と還元型 CoQ の超感度同時定量法が開発され<sup>(24)</sup>、全コエンザイム Q (Total CoQ) 中の酸化型の割合を %CoQ と定義された。この %CoQ はパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)などでも上昇することが確認された<sup>(25, 26)</sup>。

### 第3項 CoQの生合成

CoQは主にキノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成されている。ほとんどの真核生物のCoQは主にミトコンドリア内膜で合成されている<sup>(27, 28)</sup>。CoQの合成経路を図2に示す。

CoQのイソプレノイド鎖は、メバロン酸経路を介して生成される<sup>(29-31)</sup>。脳にもこれらの酵素は存在していることがわかっている<sup>(32)</sup>。ファルネシルニリン酸が、ヘテロ型酵素であるポリプレニルニリン酸合成酵素(PDSS1, PDSS2)によってイソペンテニルニリン酸を順次縮合することによって合成される<sup>(33)</sup>。このポリプレニルニリン酸合成酵素の種類は生物種によって異なるため、生物種によって合成されるイソプレノイド鎖の差長が異なる。ゆえに生物種によってCoQの種類が異なる。イソプレノイド鎖はポリプレニルニリン酸転移酵素(coq2)によって、4-ヒドロキシ安息香酸に転移する酵素である<sup>(34, 35)</sup>。その後、coq3, coq5, coq6, coq7, coq8によってキノン骨格に水酸化、メチル化、脱炭酸化などの修飾が行われ、最終的にCoQが合成される<sup>(31)</sup>。coq4は現在酵素機能が明らかにされていないタンパク質であるが、酵母による実験で、*COQ4*遺伝子の欠損株ではCoQが合成されないことから、CoQ合成に関与しているタンパク質であるとされている<sup>(36)</sup>。coq9タンパク質の機能についても未だ不明である。酵母による実験で*COQ9*遺伝子変異株ではCoQが構成できなくなったことが報告された<sup>(37)</sup>。またcoq9タンパク質はcoq3-7のタンパク質と物理的に相互作用して1MDaの複合体として検出されることが報告されている<sup>(38)</sup>。

CoQ合成酵素のcoq3-9はCoQ-complexあるいはCoQ-synthomeと呼ばれる複合体を形成し、CoQを効率的に合成していることが示唆されている<sup>(31, 39-41)</sup>。

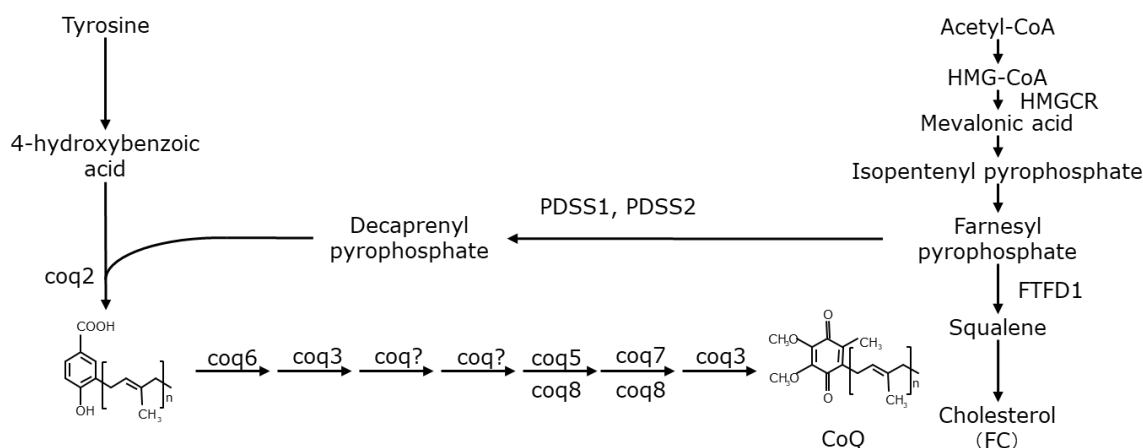


図2 CoQ合成経路

Dallmerらのラットを用いた報告によれば、CoQは肝臓切片では1.8 nmol/h/g、脳切片では0.25 nmol/h/gの速度で合成される<sup>(42)</sup>。

#### 第4項 CoQ 合成酵素の欠損による症例

CoQ 生合成遺伝子の変異による CoQ 欠損症の事例が報告されるようになってきた。

最初の CoQ 欠乏症の報告は、1989年に Ogasawara らによってされたが<sup>(43)</sup>、この時は原因の遺伝子までは特定されていなかった。CoQ 生合成遺伝子変異が病気と関わる例として最初に報告されたのは、2006年の Lopez らによる *PDSS2* 変異によるものである<sup>(44)</sup>。この報告以降、CoQ 生合成の遺伝子変異による病気がいくつも報告された。*PDSS1* の遺伝子の変異では、難聴や過食症、視神経萎縮、末梢神経障害などの症状が出ることで報告された<sup>(45)</sup>。*COQ2* の遺伝子変異では、脳筋症やステロイド耐性ネフロネーゼ症候群、多系統萎縮症(MSA)<sup>(35, 46, 47)</sup>など、が報告されている。*COQ4* 遺伝子の欠失は脳筋症など<sup>(48)</sup>が、*COQ6* の変異ではステロイド耐性ネフロネーゼ症候群や難聴、てんかんなど<sup>(49)</sup>が報告されている。*COQ8* を構成する *ADCK3* の変異では小脳性運動失調症や運動不耐性など<sup>(50, 51)</sup>が、*COQ9* の変異では広域発達不全や小脳萎縮、腎尿細管機能異常など<sup>(52)</sup>が報告されている。

脳萎縮の原因は、神経細胞の細胞死であると考えられているが、2021年 Sugiyama らにより、神経細胞の樹状突起の短縮が脳萎縮に関連することが報告された<sup>(53)</sup>。

*COQ2* 遺伝子変異をもつ多系統萎縮症患者の細胞から作製された iPS 細胞をニューロンに分化させたところ、神経突起タンパク質である TAU が減少したことも報告された<sup>(54)</sup>。

#### 第5項 治療における CoQ 投与の事例

##### 5-1 パーキンソン病(PD)

PD の特徴は、運動緩慢、硬直、安静時振戦や、姿勢の不安定などがある<sup>(55)</sup>。PD 患者の CoQ 量が減少していることや<sup>(56, 57)</sup>、患者の脳脊髄液中の%CoQ(Total CoQ 量に対する酸化型 CoQ の割合)は、健常者に比べて有意に高かったことが報告されている<sup>(58, 59)</sup>。

PDにおける CoQ10 の効果に関する研究で、3ヶ月間毎日 200 mg の CoQ10 を使用した 10 人の被験者を対象とした非盲検試験では、統合 PD 評価尺度(UPDRS)の運動スコアと運動テストに有意な効果は見られなかった<sup>(60)</sup>。未治療の早期 PD 患者 80 人を対象とした、無作為化二重盲検プラセボ対照多施設第 II 相研究では、最大 16 ヶ月間、またはドーパミン作動性治療を必要とする障害が発生するまで、300 mg, 600 mg, 1200 mg の用量でテストした<sup>(61)</sup>。被験者は、1日あたり 1,200 IU のビタミン E も摂取した。その結果、8ヶ月目の時点で、毎日 1200 mg を摂取したグループで、PD の悪化に、有意な遅延が見られた。

## 5-2 アルツハイマー型認知症(AD)

AD は進行性の神経変性疾患であり、主な特徴として、記憶障害や空間/時間的見当識障害がある<sup>(62)</sup>。

マウスを用いた実験では、CoQ10 と  $\alpha$ -トコフェロールを同時に投与させることで、高齢マウスの学習が改善されたことが報告された<sup>(63)</sup>。CoQ10 の補給が、アルツハイマープレセニリンを過剰発現させたトランスジェニックマウスによる A $\beta$  の過剰産生を抑制した<sup>(64)</sup>。

日本人被験者を対象とした前向きコホート研究では、血清 CoQ10 濃度と障害性認知症のリスクとの間に逆相関があることが発見され、CoQ10 が AD の発症の予測因子である可能性があることが示唆されている<sup>(65)</sup>。しかし、軽度から中等度の AD 病患者を対象とした無作為対象試験では、400 mg の CoQ10 を 1 日 3 回 16 週間投与したが、脳脊髄液中の酸化ストレスまたは神経変性マーカーの指標は改善されなかった<sup>(66)</sup>。

## 5-3 ハンチントン病(HD)

HD は、常染色体優性の神経変性疾患であり、精神症状、認知症、運動症状などを伴うのが特徴である<sup>(67)</sup>。

Kasparováらは、ラットを用いた HD 病モデルにおける、CoQ10 とビタミン E の投与による、脳エネルギー代謝に対しての効果を報告している<sup>(68)</sup>。

HD の 10 人の被験者が、CoQ10 の忍容性と有効性の 6 ヶ月間の非盲検試験で研究された。1 日あたり 600 mg から 1200 mg の範囲で、3 ヶ月または 6 ヶ月 CoQ を投与したところ、臨床スコアに有意な影響はなかった<sup>(69)</sup>。早期 HD の 174 人の被験者に 300 mg の CoQ10 を 1 日 2 回、無作為化、プラセボ対照、多施設、二重盲検試験を行った CARE-HD 試験では、患者は 4~5 ヶ月ごとに 30 ヶ月間追跡されたが、30 ヶ月の時点で、どの治療法でも機能低下の有意な減少は観察されなかった<sup>(70)</sup>。

## 5-4 多系統萎縮症(MSA)

MSA は、パーキンソニズム、小脳性運動失調、および錐体機能不全のさまざまな組み合わせに加えて、自律神経不全を臨床的に特徴とする進行性の神経変性疾患である<sup>(71)</sup>。COQ2 に複合ヘテロ接合ナンセンス (R387X, c.1159C>T) およびミスセンス (V393A, c.1178T>C) 変異を持っていた。この 2 つの変異を持っている患者のリンパ芽球細胞内 CoQ 量が低いことが報告されている<sup>(47)</sup>。この変異を持っている患者に対し、CoQ を 3 年以上 1200 mg/day で服用し続けたところ、脳酸素代謝率は著しく増加した<sup>(72)</sup>。脳脊髄液 (CSF) 中の CoQ10 量は、1200 mg/day 投与の 12, 24, 36 ヶ月後にそれぞれ 7.36, 9.14, 14.06 ng/mL であったが、36 ヶ月の時点で、臨床評価尺度 (Barthel index, SARA, ICARS, および UMSARS) のスコアの評価では、顕著な変化は見られなかった。脳の MRI 所見も 3 年間変化がなかった<sup>(72)</sup>。



## 第6項 CoQの吸収と輸送

CoQは生体内で合成できる物質である。しかし、第5項で前述したように、疾患により生体内のCoQ量が少なくなっている場合<sup>(41, 73)</sup>や、また加齢により減少することが報告されている<sup>(74)</sup>。ヒト臓器中において、CoQの濃度の高い臓器順に、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、すい臓、肺である。年齢別におけるCoQの濃度は、すい臓と腎臓では1歳時に、それ以外の臓器では20歳をピークにその後減少する。ヒト脳中のCoQ濃度も加齢で減少することが報告されている<sup>(75, 76)</sup>。

CoQはATP合成にも必須の因子であることから、加齢などで減るCoQを補うために、サプリメントなどによる接種が推奨されている。また、スタチン系の薬を飲んでいる患者のCoQ量が低下していることが示されており<sup>(77, 78)</sup>、CoQのサプリメントが推奨されている。

食事やサプリメントなどに含まれるCoQが吸収され、血中にどの程度の時間とどまるのかについて調べられた報告<sup>(79)</sup>では、CoQ摂取後6.5時間まで血漿中のCoQ濃度は上昇し、その後40%程度減少した。その後再びCoQ量は緩やかに上昇し、摂取後24時間後に、2番目のピークを迎え、これ以降は徐々に減少し6日後にはほとんど消失した。2番目のピークが存在する理由については、CoQが肝臓に取り込まれ、その後リポタンパク質に組み込まれたものが血中に放出したためだと考えられている。

脂質をラットの腹腔内に投与し、循環系への取り込み効率を見た実験では、脾臓や肝臓には高濃度に取り込まれたが、腎臓、筋肉、脳にはほとんど取り込まれなかった<sup>(80)</sup>。ヒトと同じCoQ10を合成するモルモットに、放射性CoQを静脈注射した実験では<sup>(81)</sup>、静脈注射24時間後の各臓器重量当たりの放射活性は、多い順に副腎、肝臓、脾臓、心臓、腎臓、脳である。

この結果から、CoQは肝臓や脾臓に入りやすいが、脳には入りにくいと考えられている。前項での、神経疾患患者を対象としたCoQ投与の臨床実験において、有意な差を持って回復した例がほとんどなかったのも、CoQが脳へ到達しにくいのが一つの理由であると考えられる。

## 第2節 コレステロール

第1節第3項の図2に示すように、コレステロールの合成経路はCoQの合成経路と一部共通した、メバロン酸経路から合成される<sup>(82)</sup>。脳のコレステロール量は全身の中で最も多い<sup>(83)</sup>。成人の脳におけるコレステロールの約70~80%は、ニューロンとアストロサイトの細胞質部分的に存在し、細胞の形態に影響を与え、細胞表面の受容体を安定化し、シナプス伝達を調節する<sup>(84)</sup>。コレステロールは神経突起伸長、シナプス形成、および神経伝達物質の放出に必要な新しい膜の形成にも不可欠であり、神経細胞の分化と成熟に重要な役割を果たす<sup>(85-88)</sup>。脳はほかの臓器と異なり、脂質の取り込みは限られている<sup>(80)</sup>ため、脳コレステロールの大部分は、内因的に合成されるものであることが知られている<sup>(89)</sup>。

コレステロールの代謝の変化は、ADなどの神経変性疾患を含む様々な状態との密接な関係を示唆する証拠が増えている。PDやHDなど、いくつかの神経変性疾患や神経発達障害はコレステロール恒常性の変化に関連している<sup>(90-92)</sup>。

コレステロール合成の阻害剤の投与がADの有病率を低下させる可能性が議論されているが、これまでに提示された研究からは、確固たる結論を導き出すことはできていない<sup>(83)</sup>。

## 第3節 ミトコンドリアについて

### 第1項 構造

ミトコンドリアは異なる2枚の膜で囲まれ、内膜で囲われた内側部分をマトリックス、二枚の膜で囲まれた間を膜間腔と呼ぶ。内膜はマトリックスの内側に向けて複雑に織り込まれており、これをクリステと呼ぶ。これにより内膜の面積を拡大させている。ミトコンドリアはミトコンドリアDNA(mtDNA)と呼ばれる、独自のDNAを持っている。mtDNAは2本鎖の環状構造であり、ミトコンドリアに2~10 copies程度含まれていると考えられている。mtDNAの大きさは約16 kbpであり、2つのrRNA、22のtRNA、13のポリペプチドをコードする37の遺伝子を含んでいる<sup>(93,94)</sup>。

ミトコンドリアの内膜は、リン脂質の1種であるカルジオリピンの含有量が非常に高い。そのため、内膜には様々な輸送タンパク質が存在し、代謝に必要な基質などをこれによって透過させる。ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系には約60種類のたんぱく質が関与しており、4つのタンパク質複合体IからIVを形成している。電子伝達系に関与するほかの因子としては、CoQや、シトクロムcがある。2000年に、Blue Native Gel Electrophoresis (BN-PAGE)を使用した研究によって、ミトコンドリア呼吸鎖複合体が相互作用し、ミトコンドリア呼吸鎖超複合体(Supercomplexes: SC)と呼ばれる大きな構造を形成することが実証された<sup>(16)</sup>。

## 第2項 機能

ミトコンドリアの機能は ATP 産生，ヘムおよびステロイドホルモンの合成，カルシウムおよび鉄の恒常性とその後のシグナル伝達カスケード<sup>(95)</sup>，脂肪酸酸化，および小胞体 (ER) とのオルガネラ間接触の調節など<sup>(96)</sup>，非常に多岐にわたる。ここでは，ATP 産生とステロイドホルモンの合成についてのみ詳しく説明する。

### 2-1 ATP 産生

ATP の合成経路には，酸素を必要としない嫌氣的な解糖系と，酸素が必要な酸化的リン酸化がある。酸素を使うことでグルコースを CO<sub>2</sub> と H<sub>2</sub>O にまで完全に酸化させることにより，大量の ATP を産生することができる。ミトコンドリアのもつ機能の一つは，この酸化的リン酸化を行うことである。

電子伝達系では，クエン酸回路により生じた NADH から電子を受けており，最終的に酸素分子を還元する。CoQ は複合体 I と III，複合体 II と III の，シトクロム c は複合体 III と IV の間の電子の伝達を行う。電子が受け渡される過程で，H<sup>+</sup> がマトリックスから膜間腔へと組みだされる。これによりマトリックスと膜間腔の間で H<sup>+</sup> 濃度勾配が形成される。この濃度勾配を利用し，ATP 合成酵素が回り，ATP が産生される。複合体間での電子の受け渡しの際に，活性酸素種 (ROS) が発生する。SC は ROS の生成を減らすことが報告されている<sup>(97)</sup>。SC の構成障害は，神経疾患と関連していることも報告されている<sup>(98, 99)</sup>。

脳は，全身の酸素とエネルギーの約 20% を消費するほど，エネルギー需要は非常に高い器官である<sup>(100)</sup>。発達中のニューロンにおいて，樹状突起へのミトコンドリア輸送が中断されると，樹状突起の成長が著しく阻害されることが報告された<sup>(101)</sup>。このことはミトコンドリアが樹状突起に移行し，そこで ATP を合成することが，樹状突起の発達に必要であると示唆されている。

### 2-2 ステロイドホルモンの合成

ステロイドホルモンの合成は，ミトコンドリアにある酵素で開始され，ステロイドホルモンは，コレステロールから作られる<sup>(102)</sup>。具体的には，ミトコンドリアの外膜に存在するタンパク質であるトランスロケータータンパク質 (18 kDa) によって，ミトコンドリア外膜から内膜へコレステロールが移行し<sup>(103, 104)</sup>，移行したコレステロールはミトコンドリア内膜に存在する酵素である P450<sub>scc</sub> (Cyp11A1) の活性化によって，最初のステロイドのプレグネノロンに代謝される<sup>(104, 105)</sup>。Cyp11A1 はステロイド合成の律速酵素である<sup>(104)</sup>。プレグネノロンは，3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3β HSD) によってプロゲステロンに変換される，または，17α-ヒドロキシラーゼ/17,20 リアーゼ (CYP17) によって 17-ヒドロキシプレグネノロンに変換される。CYP17 はプロゲステロンを 17-ヒドロキシプロゲステロンに変換できる。17-ヒドロキシプレグネノロンと 17-ヒドロキシプロゲステロンは CYP17 によってそれぞれ，デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) とアンドロ

ステンジオンに変換される。17 $\beta$ -HDS によって DHEA はアンドロステジオールに、アンドロステンジオンはテストステロンに合成される。アロマトーゼはアンドロステンジオンとテストステロンをそれぞれエストロンとエストラジオールに変換する。

脳で合成されるステロイドホルモンを、神経ステロイドと呼ぶ。脊椎動物のほとんどが、神経ステロイドを合成している<sup>(102)</sup>。

#### 第4節 神経細胞培養におけるサプリメント含有物

いくつかの報告では、トランスフェリン、インスリン、およびプロゲステロン(TIP)を含む無血清培地が、さまざまな神経系組織からの細胞の培養に有用であることが示されている<sup>(106,107)</sup>。実際、ニューロンおよび神経幹細胞培養用の多くの市販の培地添加剤には、TIP が含まれている。たとえば、Thermo Fisher Scientific が出している、B-27™ Supplement には、TIP が含まれている。また、R&D System の N2-MAX および N21-MAX という、神経細胞を増殖させるための培地サプリメントにも含まれている。この節では、トランスフェリン、インスリン、プロゲステロンについて、特に脳における効果について概説する。

##### 第1項 トランスフェリン

鉄は酸素輸送や、ミトコンドリア呼吸における電子伝達への関与、髄鞘形成、神経伝達物質の合成と代謝など、脳内で多くの重要な役割を果たす<sup>(108)</sup>。一方で、鉄は細胞内フリーラジカルの生成など酸化ストレスの進行にも関与する<sup>(109,110)</sup>。

鉄はトランスフェリンに結合し血液を循環する。脳は、血液脳関門(Blood brain barrier: BBB)によって物理的に分離されている。トランスフェリンはエンドサイトーシスによって BBB を通過するほか、脳の鉄の状態によって、トランスフェリン受容体の分布が変化し脳への鉄の輸送を調節していると提唱されている<sup>(111)</sup>。

##### 第2項 インスリン

インスリンの最も重要な役割は血糖値を制御することであるが、インスリンや、インスリン様ペプチドには、細胞の成長と増殖の調節、生殖や老化などの生理学的プロセスなど、ほかにも多くの機能がある。インスリンは HMG-CoA 還元酵素に働きかけることでメバロン酸経路を促進することがわかっている<sup>(112,113)</sup>。

インスリンとその類縁物質は脳でも産生され、神経細胞の生存を促進し、シナプス伝達を調節すると考えられている。中枢神経のインスリン受容体は、食物の摂取<sup>(114)</sup>、学習<sup>(115)</sup>、記憶の制御<sup>(115,116)</sup>、およびアルツハイマー病<sup>(117,118)</sup>などの病態生理学に関与している。

インスリンは発見当初、BBB を通過できないと考えられていたが、1967 年に、犬で血漿インスリンの増加後に、脳脊髄液(CSF)でインスリンの濃度が増加することが実証され<sup>(119)</sup>、インスリンが血液-CSF 関門を通過できることが示唆された。1980 年代になって、末

梢循環からのインスリンが BBB を通過する証拠が提供されるようになった。1983 年には、ヒト脳中のインスリン濃度が、血液よりも遥かに高い濃度であることが発見され、さらに、ヒトの死体、マウス、およびラットの脳と脊髄に高濃度のインスリンがあることが示された<sup>(120)</sup>。

### 第3項 プロゲステロン

プロゲステロンは主要な性ホルモンであり、その最も特徴的な機能は生殖調節である。加えて、プロゲステロンは中枢神経で合成される内因性ステロイドである神経ステロイドの一種でもある。プロゲステロンは神経変性疾患および精神疾患において重要な効果を発揮することが報告されている<sup>(121-124)</sup>。

プロゲステロン受容体は脳で広く発現しており、すべての神経細胞タイプに存在することが報告されている<sup>(125)</sup>。脳にはプロゲステロンを代謝する能力も持ち、プロゲステロンとその代謝物であるアロプレグナノロンは、特に損傷した脊髄で顕著な神経保護効果があることが既に知られている<sup>(126)</sup>。

プロゲステロンはコレステロールの合成を阻害することが知られている。Ono らは、*in vitro* において、プロゲステロンがメバロン酸からのコレステロール合成を阻害したことを報告した<sup>(127)</sup>。Metherall らによって、細胞へのプロゲステロン投与が細胞内コレステロール量を低下させたという報告もある<sup>(128, 129)</sup>。

## 第5節 目的

神経細胞が神経回路網を形成することで、脳は複雑な機能を持つ。神経回路網を形成するには、神経細胞が神経突起を伸長させる必要がある。神経突起の伸長にはミトコンドリアでの ATP 産生が必要である。CoQ はミトコンドリア電子伝達系において ATP 産生をするために必須の因子である。CoQ の低下は、神経系へ影響を与えることが示唆されており、神経細胞内 CoQ 量の維持は重要であると考えられる。しかし、CoQ 投与を行った臨床実験では、有意な差を持って回復した例はほとんどない。理由として、血中から脳へは CoQ が移行しにくいことが考えられる。実際、脳脊髄液中 CoQ 量が増加した例でも、一日 1200 mg の投与が必要であったうえ、増加した CoQ 量が十分であったかも不明である。脳へ取り込まれにくい理由の一つとしては、BBB を通過する CoQ の移動が不十分である可能性がある。

神経系における CoQ の役割が注目されているものの、正常な神経細胞における CoQ の挙動には不明な点が多く残されている。単一種類の神経細胞を用いて CoQ の量やその役割について解析された報告は少ない。例えば、神経細胞への分化前後での CoQ 量の変動や、神経細胞培養時のサプリメント有無による CoQ 量の変動は不明である。また、脳へは CoQ が取り込まれにくいことが報告されている。神経細胞の CoQ 量増強メカニズムを解明し、CoQ 投与に寄らない方法での神経細胞の CoQ 量を増やす手法の探索が求められる。

本論文では、神経細胞と CoQ の関係性について明らかにすることを目的とした。使用する細胞種として、iPS 細胞やニワトリの初代培養細胞などを用いることも検討したが、iPS 細胞では細胞数を確保するのが容易ではなく、動物からの初代培養細胞では、目的以外の細胞の混入リスクがある。これらのことから、単一種類の大量培養が可能であり、神経細胞モデルとして古くから用いられている PC12 細胞を主に使用した。PC12 細胞は NGF を添加することで、交感神経様細胞に分化する。細胞の分化前後の CoQ 量を調べるために、NGF 添加有無での細胞内 CoQ 量を比較した。また、神経細胞における CoQ 量の役割を解明するため、CoQ 量低下細胞モデルを樹立した。CoQ 量低下細胞モデルの作成には、CoQ 合成酵素阻害剤を用いた。この細胞モデルが交感神経様細胞へと分化する際の影響についても測定した。細胞内 CoQ 量を増加させる因子の探索として、神経細胞培養サプリメント含有物に着目し、解析を行った。

## 第2章 細胞内 CoQ 量は、神経細胞の分化に伴い増加し、神経突起の伸長に重要である

### 第1節 概要

CoQ はミトコンドリアの電子伝達系に重要な脂質であり、CoQ には酸化型と還元型の 2 種類が存在するが、還元型はフリーラジカルを消去する重要な抗酸化物質でもある<sup>(21-23)</sup>。

いくつかの神経疾患は、CoQ を合成する酵素の変異によって引き起こされることが報告されている。例えば、多系統萎縮症患者において *COQ2* のホモ接合変異が報告されていること<sup>(47)</sup>や、*COQ1* を構成する *PDSS1*, *PDSS2* の変異により、多臓器病変、またはリー症候群及び腎症を呈することが確認されている<sup>(44, 45)</sup>。*COQ8* の遺伝子変異は、小脳萎縮、発達遅延および高乳酸血症を伴う進行性神経障害を示すことが報告されている<sup>(50, 51)</sup>。これらの場合、CoQ 量が減少していることが指摘されている。他にも、PD では CoQ10、特にその還元型の量が、血漿及び血小板で低下すると報告されている<sup>(59)</sup>。

CoQ の投与が、神経疾患モデル動物に対して有効であったという報告もいくつかある。例えば、McDonald らは、老齢マウスに CoQ10 と  $\alpha$ -トコフェロールを同時に投与させることで、学習が改善されたことを報告した<sup>(63)</sup>。Kasparová らは、ラットを用いた HD の動物モデルにおける脳エネルギー代謝に対する CoQ10 とビタミン E の効果を報告した<sup>(68)</sup>。

CoQ はビタミン C や E などと異なり、生体内で合成される<sup>(28)</sup>。哺乳動物細胞では、CoQ の生合成は、コレステロールの生合成と同様に、メバロン酸経路を介してアセチル-CoA から行われる<sup>(31)</sup>。脳においても、メバロン酸経路の酵素システムをもつ<sup>(32)</sup>。Dallner らは以前に、肝臓切片におけるコレステロールと CoQ の生合成速度は、それぞれ 416 と 1.8 nmol/h/g、脳切片では、それぞれ 5.5 と 0.25 nmol/h/g であると報告した<sup>(42)</sup>。脳における CoQ 生合成の速度は肝臓よりも低い、CoQ 生合成酵素の変異によって引き起こされる疾患で見られるように、脳における CoQ は神経機能を維持するために重要である。他のいくつかの臓器とは対照的に、脳による循環からの脂質の取り込みは限られている<sup>(80)</sup>。そのため、この脂質の内因性合成は、神経系において非常に重要であると考えられている。

生物によって CoQ のイソプレノイド鎖の長さが異なることにより、生物が合成する CoQ の種類が異なる。哺乳類細胞では、ホモサピエンスは CoQ10 を合成するが、ラットやマウスでは CoQ9 を合成する。体内の CoQ 濃度は、生物の成長とともに増加することが示されている<sup>(74)</sup>。たとえば、人間の心臓では、CoQ 量は生後 1 日目から増加し、20 歳でピークに達し、その後年齢とともに減少することが報告されている。ニューロンにおける CoQ の量は多くの注目を集めているが、分化中の CoQ 量の変化は調査されていない。

第2章では、神経突起伸長前後の CoQ 量を培養神経細胞株で研究した結果をまとめた。用いた細胞は、主にラット由来の PC12 細胞であるが、マウス由来の N1E-115 細胞も一部で使用した。細胞がニューロンに分化する過程で、CoQ 量が劇的に増加した。神経突起の伸長は、ニューロンの重要なイベントである。

## 第2節 方法

### 第1項 細胞培養

細胞は、ラット副腎髄質由来の褐色細胞腫である PC12 細胞と、マウス神経芽細胞腫である N1E-115 細胞を用いた。

PC12 細胞は DMEM/F-12(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)に 10%ウマ血清(Thermo Fisher Scientific), 5%FBS(Thermo Fisher Scientific), 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した培地で, 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。PC12 細胞を分化させるためには, NGF(20 ng/mL)(Alomone Labs, Jerusalem, Israel)を添加した無血清培地で培養した。具体的には培養細胞を NGF 添加培地に 2 日おきに交換し, 計 4 日間 NGF に暴露させた。

N1E-115 細胞は DMEM(SIGMA, St. Louis, MO, USA)に 10%FBS と 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した培地で, 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。N1E-115 細胞を分化させるためには, 培地中の血清を除去した培地に 2 日おきに交換し, 計 4 日間培養した。これらそれぞれの細胞は, どちらも I 型コラーゲンでコーティングされた 6 well プレートに, 1 well あたり  $1.0 \times 10^6$  cells/mL の濃度で 2.5mL ずつ播いて培養した。

### 第2項 ミトコンドリアの単離

ミトコンドリアの単離は, Wallace の方法<sup>(130)</sup>を使用した。細胞を分離バッファー(210 mM マンニトール, 70 mM スクロース, 0.1 mM EDTA, 0.5 % BSA (脂肪酸を含まない), および 5 mM HEPES, pH 7.2)で収集した。次に, 懸濁液を, ホモジナイザーを用いてホモジネートし, 4°C で  $1,000 \times g$  で 10 分間遠心分離した。上清を回収し, 4°C で 15 分間,  $8,500 \times g$  で遠心分離し, ペレットをミトコンドリア画分として使用した。

### 第3項 神経突起長の測定

培養細胞を倒立位相差顕微鏡(#CKX41, OLYMPUS, 東京, 日本)で 100 倍の倍率で観察した。これをカメラ(#IX71, OLYMPUS)で撮影し, 印刷した。印刷した写真の神経突起の長さを定規で測定した。経時的な神経突起の長さの測定変化については, NGF 投与 1 日のサンプルでは写真 1 枚当たり,  $185 \pm 76$  個の神経突起を計測した。NGF 投与 2 日間のサンプルでは, 写真一枚当たり  $417 \pm 96$  個の神経突起を計測し, NGF 投与 4 日間のサンプルの写真には, 一枚当たり,  $315 \pm 84$  個の神経突起を計測した。写真はそれぞれのサンプル当たり 6 枚測定し, この平均値をグラフにした。結果は, NGF 投与 1 日の相対値と比較した。

4-NB 処理の実験では, NGF および 4-NB 処理の 4 日後に撮影した写真を使用した。NGF 投与群では,  $111 \pm 3$  個の神経突起が写真に存在していた。NGF+4-NB 処理群では, 各画像に  $33 \pm 10$  個の神経突起が含まれていた。写真は 3 枚測定し, この平均値をグラフにした。結果は, NGF のみの投与群と比較した。



#### 第4項 脂質測定

細胞内の CoQ および FC の濃度は、以前に報告されたものに、わずかな変更を加え、HPLCを用いて測定した<sup>(131)</sup>。簡単に説明すると、2-プロパノールで回収した細胞を遠心分離し、得られた上清を HPLC システムに注入した。2つの分離カラム(Ascentis® C8, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d. および Supelcosil™ LC-18, 3 µm, 5 cm × 4.6 mm i.d.; Supelco Japan, 東京, 日本)および還元カラム (RC-10, 15 mm × 4 mm i.d.; IRICA, 京都, 日本)を使用した。サンプルは、ECD と UV によって検出した。分離カラムの移動相は、50 mM NaClO<sub>4</sub>, メタノール/2-プロパノール (85/15, v/v)であり、0.8 mL/min の流速で流した。カラムの温度は 25 °C に設定した。

#### 第5項 CoQ 低下細胞モデルの作成

PC12 細胞の CoQ 量を低下させるために、CoQ 生合成阻害剤として知られている 4-ニトロ安息香酸(4-NB)を使用した<sup>(132, 133)</sup>。PC12 細胞は、最終濃度 1 mM の 4-NB で培養した。4-NB を DMSO に溶解し、同量の DMSO を投与した細胞株を Control とした。4-NB は 11 か月間投与した。

## 第6項 RNA測定

全RNAは、培養PC12細胞からTRIzol試薬とPhasemaker™ Tubes (Thermo Fisher Scientific)を使用して調製した。cDNAは、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Venlo, オランダ)を用いた逆転写によって合成した。PCRプライマーを表1に示す。qPCR (15分間95℃, その後15秒間95℃, 30秒間72℃の40サイクル, 30秒間60℃の最終伸長ステップ)は、QuantStudio® 5 (Thermo Fisher Scientific)を使用して実施した。遺伝子発現は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を用いて計算した<sup>(134)</sup>。

表1 リアルタイムPCRに用いたプライマー一覧

Gene	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')
<i>TH</i>	GTGAACCAATCCCCATGTG	CAGTACCGTTCCAGAAGCTG
<i>GAP-43</i>	CGACAGGATGAGGGTAAAGAA	GACAGGAGAGGAAACTTCAGAG
<i>GAPDH</i>	GTTACCAGGGCTGCCTTCTC	GATGGTGATGGGTTTCCCGT
<i>PDSS1</i>	GAAAGGTTTGCCCACTACCT	CATCTGGTCAGAACATGAGGTG
<i>PDSS2</i>	CTTCAGATCTCTCGACACCATC	CAGTGGTAAGCAGTGGGTG
<i>coq2</i>	GATGATGCTCTGATTGGCCT	GGTGTAATCTGGTGAGCCA
<i>coq3</i>	GGATGAAGATTCTCGACGTTGG	CTCATTCAAGGTCTCCTCCAG
<i>coq4</i>	CGGAGAAGTTGTGGTAAAGTGG	CTCCCAACGCTGTTCATAGTAG
<i>coq5</i>	AGTACCAGAGTAAAGAGGACCC	TGACATTCCGGATCCCAAAG
<i>coq6</i>	CTGCTCAGAGGCCTTGATAATG	CCATCACCTAGGGTAATATGGACC
<i>coq7</i>	CCTCAGGAATCACTTTTGGCTG	GGAATGTCCTATGTAGACCAGG
<i>coq8</i>	GATCTGTCAGAGTGGAGACGTA	CTATGGGGGTCTGTTGCATT
<i>coq9</i>	AGAAGTGTCTCTAGGAGTGGG	CACTATGTGTTGCCTTTGGACC
<i>FDFT1</i>	AGCCACAAGGATGGAGTTCG	GAGTTCCGGTCCATCTTGGG
<i>PSAP</i>	CATCCTGGACATGATTAAGGGG	GAGAGGGATGTTGGACATGAAG

## 第7項 統計解析

すべての結果は、平均と標準偏差として表示した。統計的有意性は、Student's *t-test* または、一元配置分散分析(ANOVA)ののち Tukey-Kramer test によって決定した。統計分析は BellCurve for Exce(社会調査研究情報株式会社, 東京, 日本)を用いて行った。

### 第3節 結果

#### 第1項 神経細胞の分化による CoQ 量

図 3A に示すように、PC12 細胞は NGF の添加により、細胞の形状を大きく変えた。具体的には、培養時の PC12 細胞はおおよそ丸い形をしているが、NGF を添加させることで、神経突起を伸長させた。PC12 細胞はラット由来であるため CoQ9 を生合成する。図 3B に示すように、CoQ9 の還元型と酸化型の両方が、NGF の4日間の暴露によって増加したことから、分化した PC12 細胞では Total CoQ9 量も大幅に増加した。一方、CoQ と同様にメバロン酸経路を介してアセチル CoA から合成される脂質であるフリーコレステロール (FC) は、NGF の4日間暴露では変化しなかった(図 3C)。図 3B, C はビシンコニン酸法で定量した総タンパク質量によって補正した、それぞれの CoQ 量, FC 量を示す。FC 量が NGF 投与で変わっていなかったことにより、細胞の CoQ 量を FC 量で補正しても、図 3B と同様に CoQ の酸化型, 還元型, Total CoQ 量は増加した(図 3D)。これらのことから、NGF 投与による PC12 細胞の分化が、細胞内 CoQ 量を増加させたことを示した。

図 4A は、N1E-115 細胞の形態観察結果を示している。ここで示したのは、播種してから3日後に培地から FBS を4日間除去した細胞と、FBS 存在下で同時間培養した細胞である。FBS の除去のみで細胞の形態が変化し、神経突起の伸長が観察された。この細胞の CoQ 量, FC 量を測定した結果を図 4B~D に示した。FBS 除去による分化によって細胞内の CoQ 量が増加した(図 4B, D)。一方、FC 量には変化がなかった(図 4C)。以上の結果より、本章では以降の CoQ 量はすべて FC 量で補正した値を示す。

## A PC12 cells

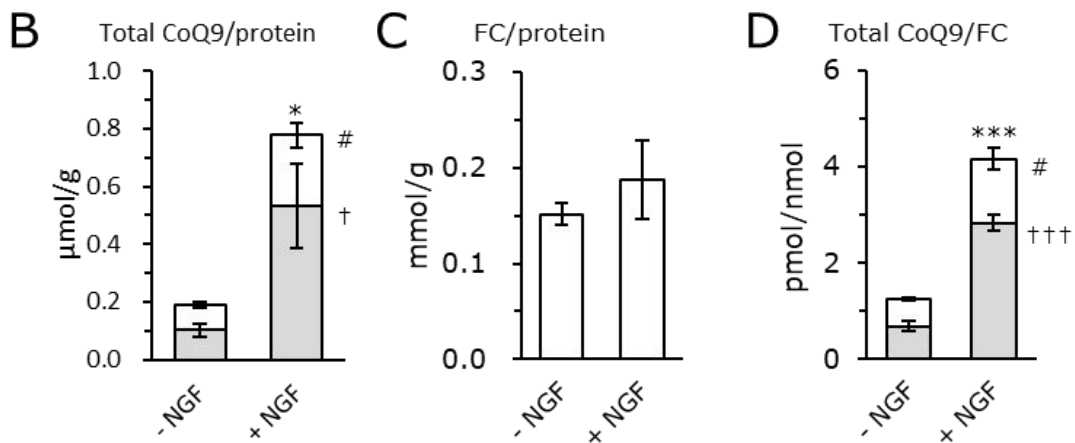
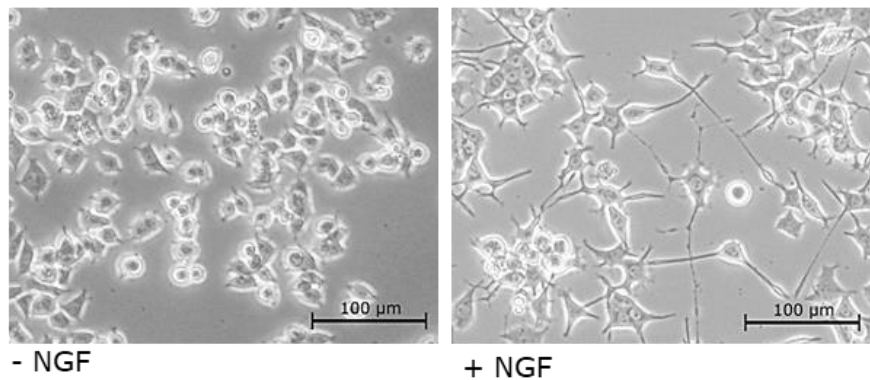


図3 PC12細胞は分化によりCoQ量が増加した

A: PC12細胞の顕微鏡写真(左: NGF添加無し 右: NGF4日間添加),

B: PC12細胞のCoQ/protein量(灰色: 酸化型CoQ量, 白: 還元型CoQ量を示す),

C: PC12細胞内のFC/protein量,

D: FC量で補正したPC12細胞のCoQ量(灰色: 酸化型CoQ量, 白: 還元型CoQ量を示す)

統計的有意性はStudent's *t*-testを用いて決定した。値は3つの独立した実験から得られたデータの平均±SD (n=3)として表した。\*および\*\*\*は、ControlのTotal CoQ値と比較した有意差(それぞれ $p < 0.05$ ,  $0.001$ )を示す。#は、Controlの還元型CoQ値と比較して有意差 $p < 0.05$ を示す。†および†††は、Controlの酸化型CoQ値と比較した有意差(それぞれ $p < 0.05$ ,  $0.001$ )を示す。

## A N1E-115 cells

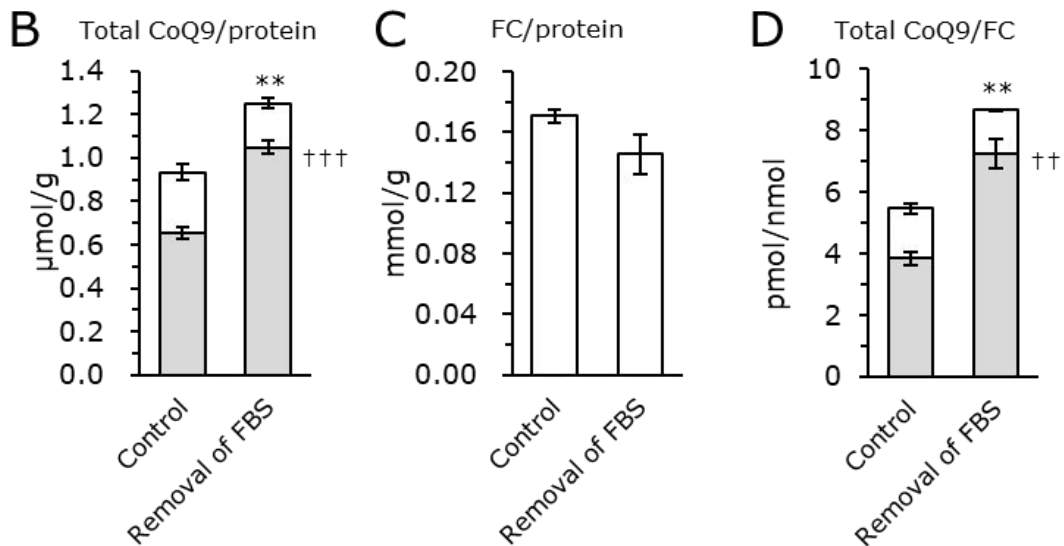
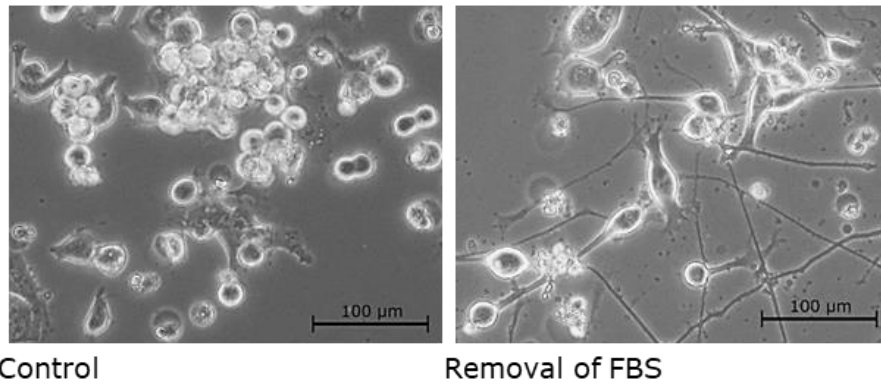


図4 分化により細胞内 CoQ 量は増加した

A: N1E-115 細胞の顕微鏡写真(左: Control(血清存在下), 右: 血清除去 4 日間),  
 B: N1E-115 細胞の CoQ/protein 量(灰色: 酸化型 CoQ 量, 白: 還元型 CoQ 量を示す),  
 C: N1E-115 細胞内の FC/protein 量,  
 D: FC 量で補正した N1E-115 細胞の CoQ 量(灰色: 酸化型 CoQ 量, 白: 還元型 CoQ 量を示す).

統計的有意性は Student's *t*-test を用いて決定した。値は 3 つの独立した実験から得られたデータの平均 ± SD (n=3) として表した。\*\*は、Control の Total CoQ 値と比較した有意差  $p < 0.01$  を示す。††および ††† は、Control の酸化型 CoQ 値と比較した有意差(それぞれ  $p < 0.01$ , 0.001)を示す。

次に、PC12 細胞に NGF を添加した後の細胞内 CoQ 量を経時的に測定した。図 5A で示したように細胞内 CoQ 量は NGF の添加時間に比例して増加した。図 5B には、経時的な神経突起長の変化を、NGF 投与 1 日目の突起長を 1 とした際の相対値で示した。図 5A および B により、PC12 細胞内 CoQ 量は神経突起が長くなるより先に、増加したことがわかる。

CoQ は原形質膜、核膜、その他の膜を含むすべての膜に存在する<sup>(23)</sup>。ミトコンドリアでの CoQ は電子伝達系としても重要である。そこで、ミトコンドリア内 CoQ 量を測定したところ、図 5C に示したようにミトコンドリア内 CoQ 量も、NGF 処理によって増加した。

これらの結果は、CoQ 量が神経分化中に増加したことを示している。次に、CoQ 量の増加メカニズムについて検討した。

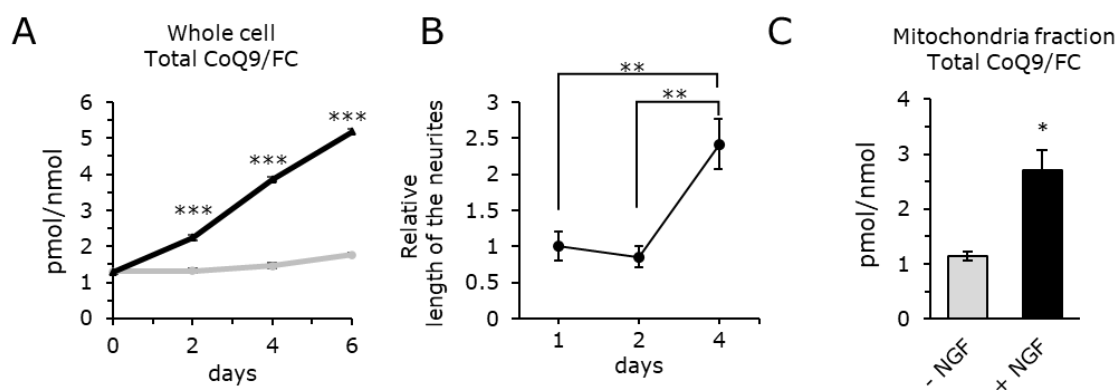


図5 NGF 投与の経時変化(CoQ 量と神経突起伸長)とミトコンドリア内 CoQ 量  
A: PC12 細胞の NGF 投与有(黒線)、投与無(灰色線)による CoQ 量の経時変化。統計的有意性は Student's *t*-test を用いて決定した。値は平均 ± SD (n=3) で示した (\*\**p*<0.001)。  
B: 神経突起伸長の経時変化。NGF 投与一日目の神経突起長を 1 とした相対値をグラフ化した。統計的有意性は ANOVA ののち Tukey-Kramer test を用いて決定した。値は平均 ± SD (NGF 1 day: n=1111, NGF 2 days: n=2499, NGF 4 days: n=1891) で示した (\*\**p*<0.01)。  
C: NGF を 4 日間添加した PC12 細胞のミトコンドリア画分の CoQ 量。統計的有意性は Student's *t*-test を用いて決定した。値は平均 ± SD (n=3) で示した (\**p*<0.05)。

## 第2項 CoQ 合成酵素遺伝子の発現量

CoQ 増加メカニズムを調べるために、まず、第1章の第1節3項の図2で示したように、CoQの合成酵素の遺伝子発現量を測定した。図6A~Cはそれぞれ上からNGF投与後1日目、2日目、4日目時点のCoQ合成酵素遺伝子の発現量を示している。これらの遺伝子の発現レベルは、PC12細胞をNGFで処理しても有意に変化しなかった。4日目時点においては、FC合成に進むための酵素であるFDFT1と、CoQ結合タンパク質としても見つかつたプロサポシン(PSAP)<sup>(135)</sup>についても測定した。PSAPはリソソームでのスフィンゴ脂質の加水分解に必要なタンパク質として有名であるが、CoQと結合することも報告された<sup>(135)</sup>。PSAPはCoQに結合するだけでなく、PSAP量の変動がCoQ量に影響を与えることが報告されている。PSAPノックダウン株の細胞内CoQ量は減少し<sup>(136)</sup>、反対にPSAP高発現株では細胞内CoQ量が増加したことも報告されている<sup>(137)</sup>。また、CoQ量を低下させた細胞において、*PSAP*遺伝子発現量が低下していたことも報告されている<sup>(138)</sup>。

これらの遺伝子を測定したところ、遺伝子発現量に有意な変化は見られなかった。これらの結果から、神経細胞分化中のCoQ9量の増加は、これらのCoQ生合成酵素のタンパク質活性の変化によるものであるか、または、まったく新しいCoQ合成メカニズムによるものである可能性が考えられる。CoQは主にミトコンドリアで合成されるが、ミトコンドリアのみで合成されるのではなく、小胞体やゴルジ体でも合成されることが報告されている。しかし、小胞体やゴルジ体でのCoQの生合成メカニズムについてはほとんど明らかにされておらず、また、細胞内CoQ合成量のどのぐらいの割合を合成しているかも不明である。神経分化における細胞のCoQ9量を増加させるメカニズムについては、さらなる検討が必要である。

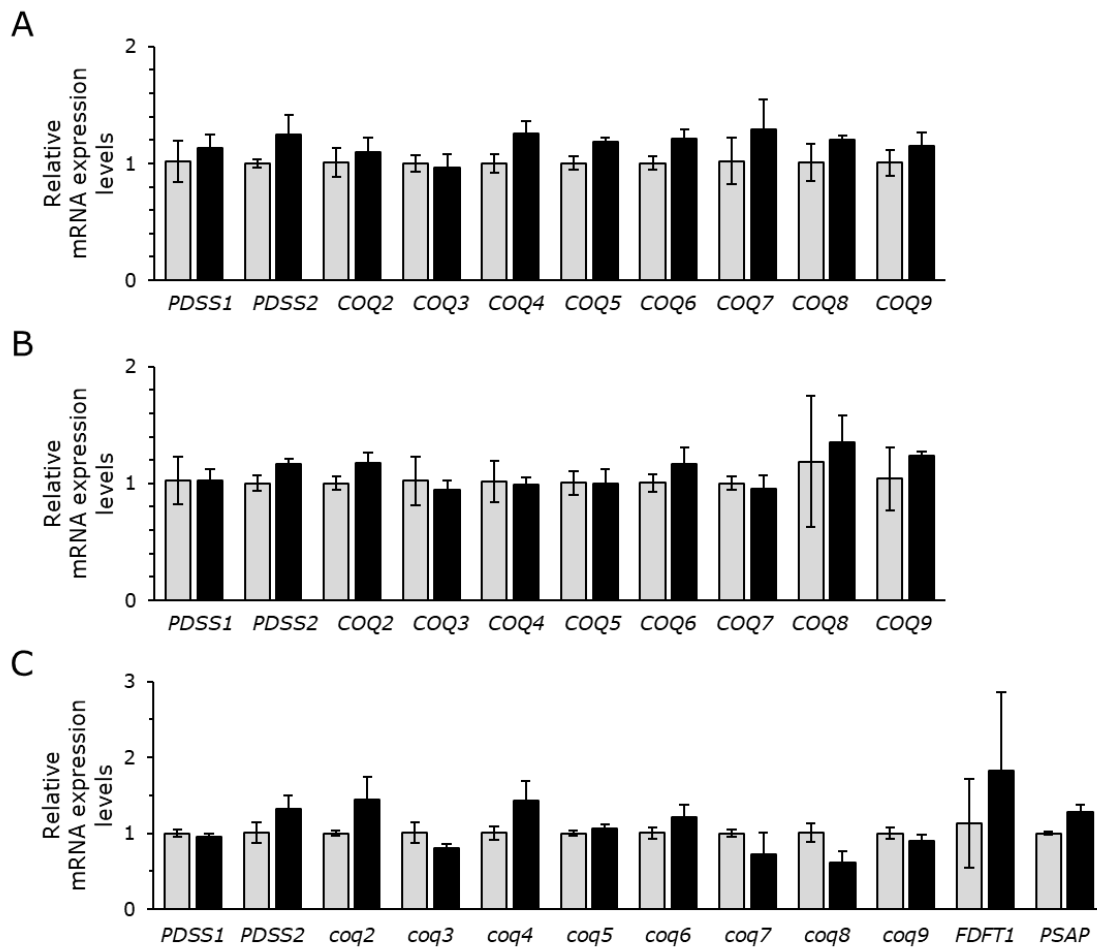


図 6 CoQ 合成酵素の遺伝子発現量の経時的測定結果

A: NGF 投与 1 日目の *PDSS1*, *PSDD2*, *ccoq2*~*9* の遺伝子発現量.

B: NGF 投与 2 日目の *PDSS1*, *PSDD2*, *ccoq2*~*9* の遺伝子発現量.

C: NGF 投与 4 日目の *PDSS1*, *PSDD2*, *ccoq2*~*9*, *FDFT1*, *PSAP* の遺伝子発現量.

A~C のパネルにおいて、灰色バーは NGF 添加無しのサンプルを表し、黒色バーは NGF 添加したサンプルであることを表す。各遺伝子は GAPDH の発現量で補正した。値は平均±SD (n=3) で示した。



### 第3項 CoQ 量低下細胞モデルの神経突起長測定

細胞分化プロセスにおける CoQ9 量の増加の役割を評価するために、CoQ 合成阻害剤である 4-ニトロ安息香酸(4-NB)を使用した。4-NB はポリプレニルトランスフェラーゼ (coq2)を競合的に阻害し、哺乳動物細胞の CoQ を用量依存的に減少させる<sup>(132, 133)</sup>。図 7 A に示したように、4-NB の投与し続けた PC12 細胞を、NGF により分化させたところ、細胞内 CoQ 量の増加度合いは低下した。神経細胞の分化マーカーである成長関連タンパク質-43(*GAP-43*)およびチロシンヒドロキシラーゼ(*TH*)の遺伝子発現量を測定したところ(図 7B と C)、NGF の投与により PC12 細胞の *GAP-43* と *TH* の mRNA の発現量は増加したが、4-NB 投与で処理した PC12 細胞では NGF 添加してもその発現量は抑えられていた。

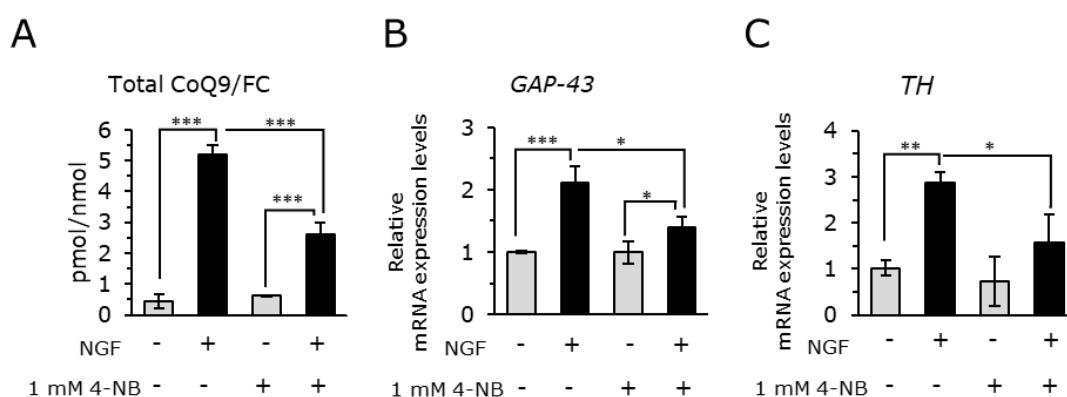


図 7 CoQ 合成阻害剤 4-NB を投与した神経分化

A: 1 mM 4-NB を投与した細胞内 CoQ 量

B: GAP-43 の mRNA 発現量.

C: TH の mRNA 発現量.

A~C のパネルにおいて、黒バーは NGF(20 ng/mL)を 4 日間暴露したサンプルであり、灰色バーは NGF 添加無しを示している。統計的有意差は ANOVA ののち、Tukey-Kramer test を用いて決定した。値は平均±SD (n=3)で示した(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。

実際に神経突起の長さを 4-NB を投与した場合と 4-NB を投与しない場合で比較した。細胞を撮影した写真を使用し(図 8A)、神経突起の長さを手動で測定した。また、神経突起の数についても計測した、図 8 B および C に示したように、4-NB の投与により神経突起数が減少しており、神経突起の長さも大幅に短縮した。

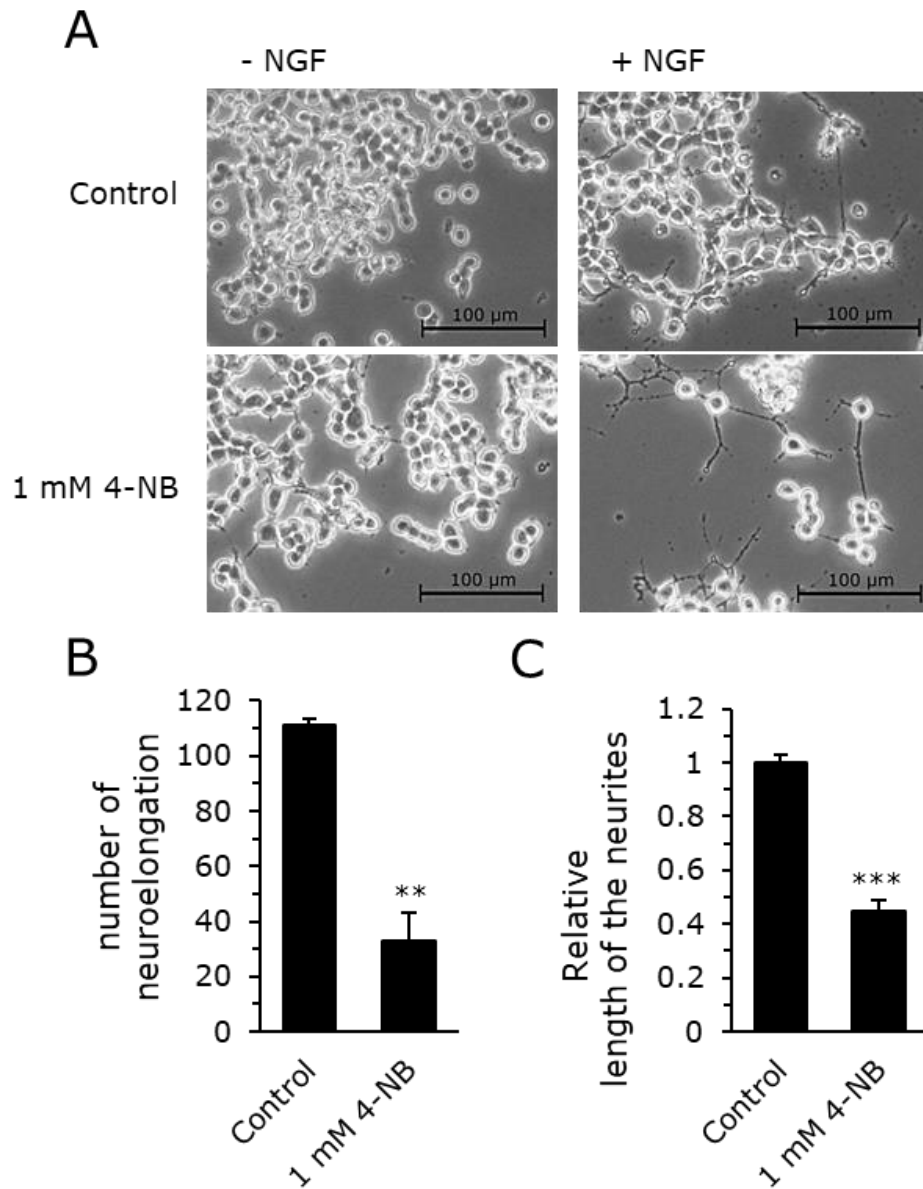


図8 CoQ 量低下細胞の形態観察，神経突起数および神経突起長

A: 4-NB および NGF 投与有無 PC12 細胞の顕微鏡観察結果.

B: NGF 投与 PC12 細胞の 4-NB 投与有無による，写真 1 枚当たりの神経突起の数. 統計的有意差は Student's t-test を用いて決定した. 値は平均±SD (n=3)で示した(\*\* $p<0.01$ ).

C: NGF 投与 PC12 細胞の 4-NB 投与有無による神経突起長. Control を 1 とした相対値で示した. 統計的有意差は Student's t-test を用いて決定した. 値は平均±SD (Control: n=334, 1 mM 4-NB: n=99)で示した(\*\* $p<0.001$ ).

#### 第4節 考察

脳の機能を理解するために、神経分化に関与する分子メカニズムを理解することは重要である。本章図3および図4で示したように、PC12細胞とN1E-115細胞の分化により細胞内CoQ量を増加させることを見出した。また図7, 図8で示したように、CoQ合成阻害剤投与株では、分化の指標である*GAP-43*や*TH*の遺伝子発現量の低下や、神経突起長の延伸が抑制された。

ニューロンの分化は、増加するエネルギーの需要を満たすために代謝の再プログラミングを伴うことが報告されている<sup>(139, 140)</sup>。例えば、マウスの網膜神経節細胞の分化において、乳酸産生の増加と解糖系酵素のmRNA発現量の上昇に伴うグルコース代謝シフトが観察されている<sup>(141)</sup>。別の報告では、PKM2からPKM1へのピルビン酸キナーゼ遺伝子スプライシングの切り替えとともに、ヘキソキナーゼおよび乳酸脱水素酵素の発現の喪失は、神経前駆細胞における好氣的解糖から神経細胞における酸化的リン酸化への移行が示された<sup>(139)</sup>。Agostiniらは、ミトコンドリアの生合成が神経細胞の分化中に増加することを報告した。ミトコンドリア生合成に付随して、彼らはまた、グルコースとグルタミン酸-グルタミン代謝の増加を観察した<sup>(140)</sup>。特に、ミトコンドリア電子伝達系のCoQはATP産生に必須の脂質である。したがって、神経分化におけるCoQ量の増加は、分化中の細胞エネルギーを維持するために重要である可能性が考えられる。

また、より高いエネルギー需要に対応するために、ミトコンドリアの再編成が繊維芽細胞の分化において重要な役割を果たすことが報告されている。例えば、ミトコンドリアの質量や、形態、機能は皮質ニューロンの分化中に変化することが報告されている<sup>(140)</sup>。NGF誘導性の分化は、ミトコンドリアの分裂および融合タンパク質を増加させ、ミトコンドリアの生合成および代謝を調節する転写因子であるmtTFAやPPAR $\gamma$ 、サーチュインファミリーの一つであるSirt3を誘導することも報告されている<sup>(142)</sup>。本章の図5Cでも示したように、ミトコンドリア画分のCoQ量は、NGF投与によって増加した。

NGFは損傷からのニューロンの発生、維持、および回復を調節する<sup>(143)</sup>。これまでの報告では、NGF処理により抗酸化酵素レベルが増加し酸化ストレスから細胞を保護することが報告されている。例えばNGFはカタラーゼとグルタチオン(GSH)ペルオキシダーゼの活性を増加させる<sup>(144)</sup>。また、GSH、GSH代謝サイクルの酵素、およびGSH/GSHペルオキシダーゼの抗酸化レドックスシステムを刺激することにより、過酸化水素処理によって誘発される酸化ストレスから細胞を保護する<sup>(145)</sup>。本章において、NGF投与がCoQ9量を増加させることを明らかにした。CoQの還元型は重要な脂溶性抗酸化物質であるため、NGFによるCoQ増加は細胞を酸化ストレスから保護する上でも重要な役割を果たすことが示唆された。

神経細胞の分化において、ミトコンドリアでのATP産生は重要である。細胞の抗酸化活性を増加させる場合、減少したCoQの量を増加させることも必要だと考えられる。CoQ9量がニューロン分化中に増加するという発見は、CoQ9が細胞エネルギー産生の調節と抗

酸化メカニズムの変化に重要な役割を果たしている可能性があることを示唆した。ニューロン分化における CoQ 量の増加の生理学的意義は今後さらに調査する必要がある。

神経分化における CoQ 量の増加のメカニズムは議論の余地がある。細胞の神経分化が PC12 細胞と N1E-115 細胞の両方で CoQ9 量を増加させることを報告したが、これら 2 つの分化は異なる刺激によるものである。PC12 細胞は NGF 投与により、神経突起を伸長し、交感神経ニューロン様に分化する。一方、N1E-115 細胞は血清除去により神経突起が伸長する。分化誘導刺激が異なる PC12 細胞と N1E-115 細胞は、しかしてどちらも分化誘導刺激により、アクチン骨格への細胞シグナル伝達に関わる Tc10 遺伝子の発現が誘導されることが報告されている<sup>(146, 147)</sup>。これは CoQ の生産システムに影響を与える可能性があるが、現時点では詳細は不明である。

PC12 細胞に着目し、CoQ 合成酵素遺伝子を解析した。サンプリング時間を変えても、遺伝子の発現が増加することはなかったことから、NGF 投与後の CoQ 量の増加は、これらの遺伝子の量とは無関係のメカニズムによって発生している可能性がある。CoQ 合成酵素は、CoQ-complex あるいは CoQ-thynsome と呼ばれる超複合体を形成し、CoQ を合成することが報告されている<sup>(40, 41)</sup>。CoQ-complex は、ミトコンドリア内膜のマトリックス面に位置している。以前の研究では、マウスにおける *Coq8* と *Coq9* の遺伝子変異が、多数の CoQ 合成酵素の選択的かつ有意な枯渇を引き起こすことが実証された<sup>(148)</sup>。免疫沈降研究も、CoQ を合成するための CoQ-complex の存在を示している<sup>(39)</sup>。CoQ 合成酵素は CoQ-complex を形成し、CoQ-complex 形成の程度が CoQ の合成活性に影響すると考えられている。CoQ 合成活性は、単に COQ 遺伝子の発現だけで定義されるわけではない。CoQ-complex の形成量の増減によって CoQ 合成量が変わる可能性がある。また、メバロン酸経路の基質量または、チロシンから合成される 4-ヒドロキシ安息香酸量によっても CoQ 量は変化する。NGF の投与は、CoQ 生合成に関わる基質量が変化、または CoQ-complex の形成量に影響を与える可能性がある。CoQ-complex はミトコンドリア内膜上に存在するタンパク質複合体であるため、ミトコンドリアを単離した後、Blue-Native PAGE または免疫沈降法を用い解析することが望まれる。

いくつかの神経疾患は、CoQ を合成する酵素の突然変異によって引き起こされることは第 1 章第 1 節でも記載したとおりである<sup>(41, 73)</sup>。そしてこれらの場合、CoQ 量が低下していることも報告されている。図 8 で示したように、あらかじめ CoQ 量の合成が阻害される状態であった細胞を分化させたことにより、神経突起伸長に関わるマーカーである *GAP-43* の遺伝子発現量が低下し、実際に神経突起の伸長も抑制された。これらのことは、分化を開始するにあたり、細胞内 CoQ 量を増加させることが重要であり、分化を開始するにあたり CoQ 量が十分合成できないことが神経変性疾患に関与していることが示唆される。また、ドーパミン作動性ニューロンへの分化を示すマーカーである *TH* の遺伝子発現量も減少していたことから、本来ドーパミン作動性ニューロン様分化できるはずの PC12 細胞が、CoQ 合成が十分でないことにより、分化が不十分であることが考えられる。ドーパミン作

動性ニューロンの喪失は、パーキンソン病の特徴の一つである。

本章の結果は、神経細胞に分化する際に CoQ 量が増加し、CoQ 生合成の阻害が正常な分化および神経突起の伸長を損ねたことを明らかにした。したがって、神経前駆細胞内の CoQ 量を維持または増加させることは、神経変性疾患の抑制に有用である可能性がある。

### 第3章 トランスフェリン・インスリン・プロゲステロンは、未分化の PC12 細胞において、CoQ および FC の細胞内濃度を調節する

#### 第1節 緒言

神経新生は、胎児期に限定され出生後には新しいニューロンは生成されないと考えられていたが、Altman と Das は成体の脳においても神経発生が起こることを報告した<sup>(149)</sup>。彼らによる報告はラットによるものであったが、ヒトにおいても成体の神経新生が報告されている<sup>(150)</sup>。

脳は人体で最も代謝が活発な機関の一つであり、特に酸化損傷を受けやすい。活性酸素種(ROS)の主な供給源はミトコンドリアであり、ATP 産生の副産物として生成される。一定量の ROS は脳においては記憶の形成や学習プロセスに重要であることが報告されているが、過剰な ROS は細胞毒性を示し、神経変性疾患の原因となる。このため ROS の過剰な蓄積を防ぐことは重要であり、抗酸化能の維持が不可欠である<sup>(151)</sup>。

CoQ はミトコンドリアの電子伝達系で ATP を産生するための必須脂質としてだけではなく、抗酸化物質としても重要な脂質である<sup>(7, 21)</sup>。しかし、CoQ 量は加齢に伴い減少し<sup>(74)</sup>、それだけでなく、パーキンソン病などの様々な疾患でも減少することが報告されている<sup>(56, 57, 59)</sup>。CoQ 生合成遺伝子の変異による、神経疾患も報告されている。例えば *COQ2* の遺伝子変異は散発性の多系統萎縮症(MSA)と関連していることが報告された<sup>(47)</sup>。PDSS1 と PDSS2 のヘテロ二量体からなる *coq1* の、*PDSS2* の遺伝子変異によってリー症候群や腎症が引き起こされることも報告されている<sup>(44)</sup>。*COQ8* の遺伝子変異では、小脳萎縮、発達遅延、高乳酸血症を伴う進行性の神経障害が引き起こされることが報告されている<sup>(50, 51)</sup>。CoQ 合成酵素遺伝子変異をもつ場合、線維芽細胞や血中リンパ球 CoQ10 量が低下している。

第2章で述べた通り、CoQ 量が低下した PC12 細胞を分化させると、神経突起伸長に関わるマーカーである *GAP-43* や、ドーパミン作動性ニューロンへの分化を示すマーカーである *TH* の遺伝子発現量の低下、神経突起長の減少が見られた。加齢により生体内の CoQ 量が減っていることは、成体における神経新生に影響を与える可能性がある。

生体内で減る CoQ を補うために、CoQ のサプリメントが注目されている。実際、CoQ の投与がいくつかの疾患に有効であることも報告されている。たとえば、2014年1月までに1つのデータベースから8つのランダム化比較試験をレビューしたメタアナリシスでは、心臓バイパス手術を受けている患者への CoQ 投与は、強心薬の使用率の低下と心室性不整脈の発症リスクの低下と関連していた<sup>(152)</sup>。2012年12月までの4つのデータベースからの3つの無作為化プラセボ対照試験の別のメタ分析では、不妊男性への CoQ10 投与は精子密度と運動性の増加をもたらした<sup>(153)</sup>。

一方で、次のような報告もある。CoQ の投与後、CoQ は主に肝臓、副腎、脾臓に取り込まれるが、神経系に取り込まれる CoQ10 量は非常に低かった。Yuzuriha らの報告では、<sup>[14C]</sup>CoQ10 をモルモットに静脈内注射した後、放射能レベルは注射後30分で肝臓と脾臓

で最も高く、その後減少した<sup>(81)</sup>。血液と腎臓のレベルは 8 時間でピークに達したが、心臓と脳のレベルは 24 時間でピークに達し、その後減少した。脳内の<sup>[14C]</sup> CoQ10 量は、肝臓、脾臓、副腎に比べてはるかに低かった。Bentinger らはラットへの放射性 CoQ10(<sup>[3H]</sup>CoQ) の腹腔内投与は、循環への効率的な取り込みをもたらし、脾臓、肝臓、および白血球には高濃度に取り込まれることを報告した<sup>(80)</sup>。副腎、卵巣、胸腺、および心臓ではより低い濃度が検出されたが、腎臓、筋肉、または脳では本質的に取り込みは発生しなかった。これらの報告から、CoQ を脳に投与することは困難であることが予測され、CoQ 投与以外での、神経系の細胞内 CoQ10 量を増加させる方法が必要である。

いくつかの報告では、トランスフェリン、インスリン、およびプロゲステロン (TIP) を含む無血清培地が、さまざまな神経系組織からの細胞の培養に有用であることが示されている<sup>(106, 107)</sup>。TIP のサプリメントはニューロンへ分化する際の神経突起の延伸に有用である。実際、ニューロンおよび神経幹細胞培養用の多くの市販の培地添加剤には、TIP が含まれている。たとえば、Thermo Fisher Scientific は、TIP を含む神経細胞培養サプリメント、B-27™ Supplement を提供している。R & D System は、神経細胞を増殖させるための培地添加剤として N2-MAX および N21-MAX 培地サプリメントを提供しているが、これにも TIP は含まれている。

本章では、細胞内 CoQ 量増加因子として、神経突起伸長の補助剤である TIP に着目した。TIP の投与による細胞の CoQ 量への効果を決定した。CoQ は、メバロン酸経路を介して、遊離コレステロール (FC) としてアセチル CoA から合成される<sup>(29-31)</sup>。このため、FC 量に対する TIP の影響も分析した。

## 第2節 方法

### 第1項 細胞培養

第2章の実験と同様に、ラット副腎髄質腫瘍（褐色細胞腫）から樹立された PC12 細胞を 10%ウマ血清, 5%ウシ胎児血清, 1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM/F-12 で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。6 well コラーゲンコートプレートに 1 well あたり  $1 \times 10^5$  cells/mL を 2.5 mL ずつ播種し, 72 時間培養した後, TIP (5 µg/mL トランスフェリン, 10 µg/mL インスリン, 8 µM プロゲステロン) を含む無血清 DMEM/F-12 培地に培地を交換し培養した。この細胞を回収し CoQ および FC 量と遺伝子発現量を分析した。また, TIP 処理後の CoQ と FC の濃度の経時測定では, 6 well コラーゲンコートプレートに 1 well あたり  $1 \times 10^5$  cells/mL を 2.5 mL ずつ播種し, 2 日ごとに培地交換を行った。TIP 処理 2 日後, 4 日後, 6 日後のサンプルを回収し測定した。

### 第2項 神経突起長測定

倒立位相差顕微鏡(#CKX41, OLYMPUS, Tokyo, Japan)を用いて培養細胞を 100 倍に拡大して観察し, カメラ(#IX71, OLYMPUS)で撮影し, 印刷を行った。印刷した写真に写っている神経突起の長さを定規で測定した。神経突起の長さの経時的変化の測定には, NGF 及び TIP 処理 4 日後に撮影した写真を使用した。NGF 処理群では,  $221 \pm 40$  個の神経突起が写真に写っていた。NGF+TIP 処理群では, 各画像に  $217 \pm 9$  個の神経突起が含まれていた。写真は 3 枚測定した。結果は, NGF 処理群に対する相対値で表した。

### 第3項 脂質測定

既報の通り, 細胞内の CoQ および FC 量は HPLC-UV, ECD を用いて分析した<sup>(131)</sup>。簡単に言えば, 細胞をイソプロパノールで回収し, 遠心分離し, 得られた上清を HPLC で分析した。2 種類の分離カラム(Ascentis® C8, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d. and Supelcosil™ LC-18, 3 µm, 5 cm × 4.6 mm i.d.; Supelco Japan, Tokyo, Japan)と還元カラム(RC-10, 15 mm × 4 mm i.d.; IRICA, Kyoto, Japan)を使用した。試料は UV および ECD で検出した。分離のための移動相は 50 mM NaClO<sub>4</sub> メタノール/イソプロパノール(85/15, v/v)で, 流速は 0.8 mL/min, カラムは 25°C に保って測定した。

### 第4項 RNA 測定

Total RNA は培養した PC12 細胞から TRIzol 試薬を用いて調製した。cDNA は QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands)を用いて逆転写することにより合成された。PCR プライマー配列を表 2 に示す。定量的 PCR は QuantStudio® 5 (Thermo Fisher Scientific) 装置で以下のように実施した。95°C で 2 分間, 95°C で 5 秒間, 60°C で 30 秒間を 40 サイクル行い, 最後に 60°C で 1 分間の伸長を行った。遺伝子発現は,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法を用いて計算した<sup>(134)</sup>。



表2 リアルタイム PCR に用いたプライマー一覧

Gene	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	GTTACCAGGGCTGCCTTCTC	GATGGTGATGGGTTTCCCGT
<i>PDSS1</i>	GAAAGGTTTGCCCACTACCT	CATCTGGTCAGAACATGAGGTG
<i>PDSS2</i>	CTTCAGATCTCTCGACACCATC	CAGTGGTAAGCAGTGGGTG
<i>coq2</i>	GATGATGCTCTGATTGGCCT	GGTGTAATCTGGTGAGCCA
<i>coq3</i>	GGATGAAGATTCTCGACGTTGG	CTCATTCAAGGTCTCCTCCAG
<i>coq4</i>	CGGAGAAGTTGTGGTAAAGTGG	CTCCAACGCTGTTCATAGTAG
<i>coq5</i>	AGTACCAGAGTAAAGAGGACCC	TGACATTCCGGATCCCAAAG
<i>coq6</i>	CTGCTCAGAGGCCTTGATAATG	CCATCACCTAGGGTAATATGGACC
<i>coq7</i>	CCTCAGGAATCACTTTTGGCTG	GGAATGTCCTATGTAGACCAGG
<i>coq8</i>	GATCTGTCAGAGTGGAGACGTA	CTATGGGGTCTGTTGCATT
<i>coq9</i>	AGAAGTGTCTCTAGGAGTGGG	CACTATGTGTTGCCTTTGGACC
<i>FDFT1</i>	AGCCACAAGGATGGAGTTCG	GAGTTCCGGTCCATCTTGGG
<i>HMGCR</i>	GCTCAGGGTAATCACTTGCT	TAGGCCTGGTTCTTGTTCAC

#### 第5項 CoQ 量低下細胞モデルの樹立

PC12細胞のCoQ量を減少させるために、第2章と同様に、4-NBを使用した。4-NBはCoQ生合成阻害剤として知られている<sup>(132, 133)</sup>。PC12細胞は、最終濃度1 mMの4-NBとともに培養された。4-NBをDMSOに溶解し、同量のDMSOを対照細胞に添加した。4-NBは6ヶ月間投与した。

#### 第6項 統計解析

すべての結果は、平均値および標準偏差で示した。統計的有意性はStudent's t-testまたは一元配置分散分析(ANOVA)ののちTukey-Kramer test, William testによって決定した。統計解析はBellCurve for Excel(株式会社社会調査研究情報センター, 東京, 日本)を用いて行った。

### 第3節 結果

#### 第1項 メバロン酸経路への TIP の影響

図 9B で示すように、TIP の添加(TIP(+))は NGF 非存在下(NGF(-))では PC12 細胞の細胞形態に影響を与えなかった。一方で、図 9C, D に示すように、NGF の添加(NGF(+))は細胞の形態に大きな変化を与え、神経突起を伸長させた。図 9C および D のサンプルにおける、神経突起長の長さを測定したところ、図 10A で示したように、神経突起長は、NGF(+)/TIP(-)の細胞と比べて、NGF(+)/TIP(+))の細胞のほうが長い傾向にあった(n=3,  $p < 0.067$ )。

CoQ は FC の合成経路と一部共通している(図 10B)。CoQ の側鎖は生物種によって異なっており、PC12 細胞はラット由来であることから CoQ9 を生合成している。図 10C は NGF(-)/TIP(-)/serum(+)および NGF(-)/TIP(+))または NGF(+)/TIP(-)あるいは NGF(+)/TIP(+))の処理をした PC12 細胞の CoQ 量を示し、図 10D は同条件サンプルの FC 量を示す。NGF(+))および TIP(+))は、無血清培地(serum(-))で培養した細胞である。細胞内 CoQ 量は、NGF(-)/TIP(+))の場合で優位に増加した。NGF(+)/TIP(-)によっても細胞内 CoQ 量は増加したが、NGF(+)/TIP(+))では、NGF や TIP による CoQ 量の増加に対する相加効果は見られなかった。これらの結果から、TIP の添加は未分化 PC12 細胞に対して影響を与え、細胞内 CoQ 量を増加させることを示した。

図 10D で示したように、FC 量は NGF(+))/-))にかかわらず、TIP(+))で減少した。

本章では、TIP 投与により FC 量にも変動があることから、CoQ 量は FC 量での補正ではなく総タンパク質量で補正した。

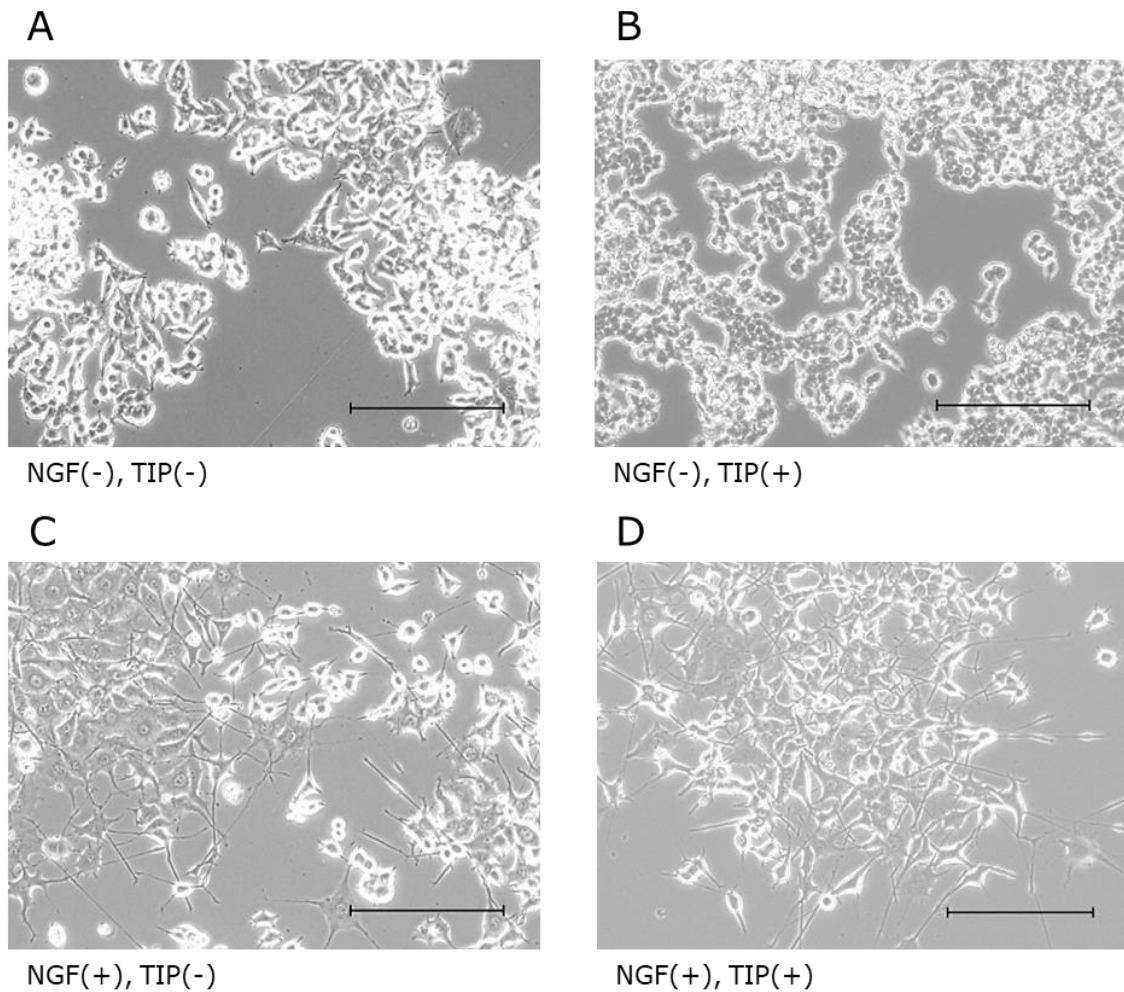


図9 TIP 処理または NGF 処理あるいは両方を添加した PC12 細胞の顕微鏡観察写真.  
 A: NGF も TIP も投与していない PC12 細胞((NGF(-)TIP(-)).  
 B: TIP のみ投与し培養した PC12 細胞((NGF(-)TIP(+)).  
 C: NGF のみ投与し培養した PC12 細胞((NGF(+))TIP(-)).  
 D: NGF と TIP を投与し培養した PC12 細胞((NGF(+))TIP(+)).

スケールバー= 200  $\mu\text{m}$ . 20 ng/mL NGF または TIP(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  トランスフェリン, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリン, 8  $\mu\text{M}$  プロゲステロン)あるいはその両方は 4 日間投与された.

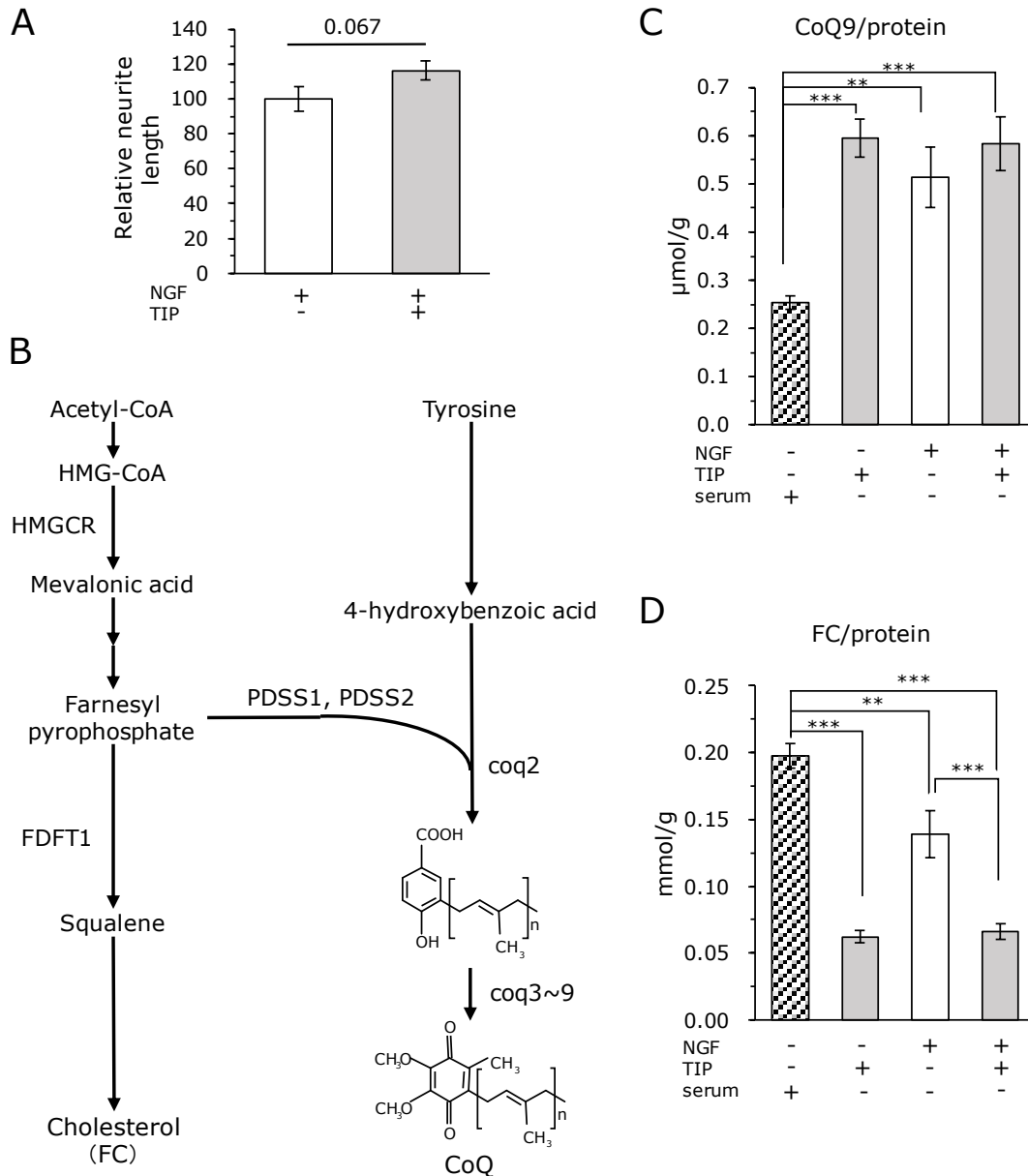


図 10 TIP 投与による CoQ および FC 量

A: TIP 有無による神経突起長測定(白: NGF(+)/TIP(-), 灰色: NGF(+)/TIP(+))

B: CoQ および FC 合成経路の概略図。

C: タンパク質量で補正した CoQ 量。

D: タンパク質量で補正した FC 量。

NGF は 20 ng/mL, TIP は 5 μg/mL トランスフェリン, 10 μg/mL インスリン, 8 μM プロゲステロンの濃度で添加した。統計的有意差は, パネル A は Student's t-test を用いて決定し, パネル C, D は ANOVA のち Tukey-Kramer test を用いて決定した。値は平均 ± SD (n=3) で示した (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。

次に、NGF(-)TIP(+)の細胞の CoQ 量を経時的に測定した。図 11A で示すように、細胞内 CoQ 量は、NGF(-)TIP(-)および NGF(-)TIP(+)の細胞の両方で時間とともに増加した。すべての時点で NGF(-)TIP(+)の細胞のほうが、NGF(-)TIP(-)よりも細胞内 CoQ 量が高かった。一方 FC 量は NGF(-)TIP(-)は経時的に増加したのに対し、NGF(-)TIP(+)は TIP 投与 4 日目まで減少し、その後その値を維持した(図 11B)。

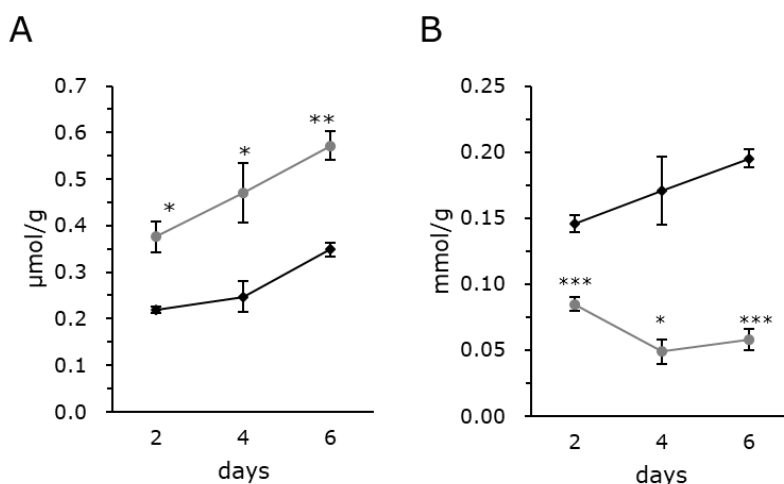


図 11 TIP 投与による CoQ 量および FC 量の経時的変化

A: 経時的に測定したタンパク質量で補正した CoQ 量.

B: 経時的に測定したタンパク質量で補正した FC 量.

パネル A および B のどちらも、黒線: NGF(-)TIP(-), 灰色線: NGF(-)TIP(+)を表す。NGF は 20 ng/mL, TIP は 5 μg/mL トランスフェリン, 10 μg/mL インスリン, 8 μM プログステロンの濃度で添加した。統計的有意差は、同時点での NGF(-)TIP(-)と NGF(-)TIP(+)を比較し、Student's t-test を用いて決定した。値は平均±SD (n=3)で示した(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。

## 第2項 細胞内 CoQ 量増加因子の探索

TIP の投与により細胞内 CoQ 量が増加したことにより、TIP のうち、どの因子が CoQ 量を増加させるかを特定することを検討した。まずは、1 種類の因子のみを投与した場合の CoQ 量の変化を分析した。しかし、血清除去培地にプロゲステロンのみの投与群とトランスフェリンのみの投与群では細胞が死んでしまったため分析できなかった。図 12A で示すように、インスリンのみの投与においても、細胞の CoQ 量を増加させた。興味深いことに、TIP の 3 つを同時に投与すると、細胞の CoQ 量が高くなる傾向があった。一方で、血清存在下での TIP 投与では、CoQ 量は増加しなかった。

次に、どの因子が CoQ 量を上昇させるかを特定するための別の方法として、各因子の濃度依存性を検討した。TIP のうち、1 つの因子のみの濃度を変化させて細胞の CoQ 量を分析した。図 12B に示すように、トランスフェリンの濃度を変化させても、細胞の CoQ 量は変化しなかった。図 12C に示すように、0 および 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のインスリン濃度では、細胞が生存できなかったため、測定ができなかった。図 12A で示したように、インスリンのみの投与でも細胞内 CoQ 量は増加したが、図 12B で示すように、インスリンの濃度を変化させても、CoQ 量に変化は見られなかった。図 12D に示すように、プロゲステロンについては、投与濃度を増やすことで、CoQ 量が増加する傾向が見られた。プロゲステロン濃度が高いと、未処理の細胞と比較して CoQ 量が高くなった。

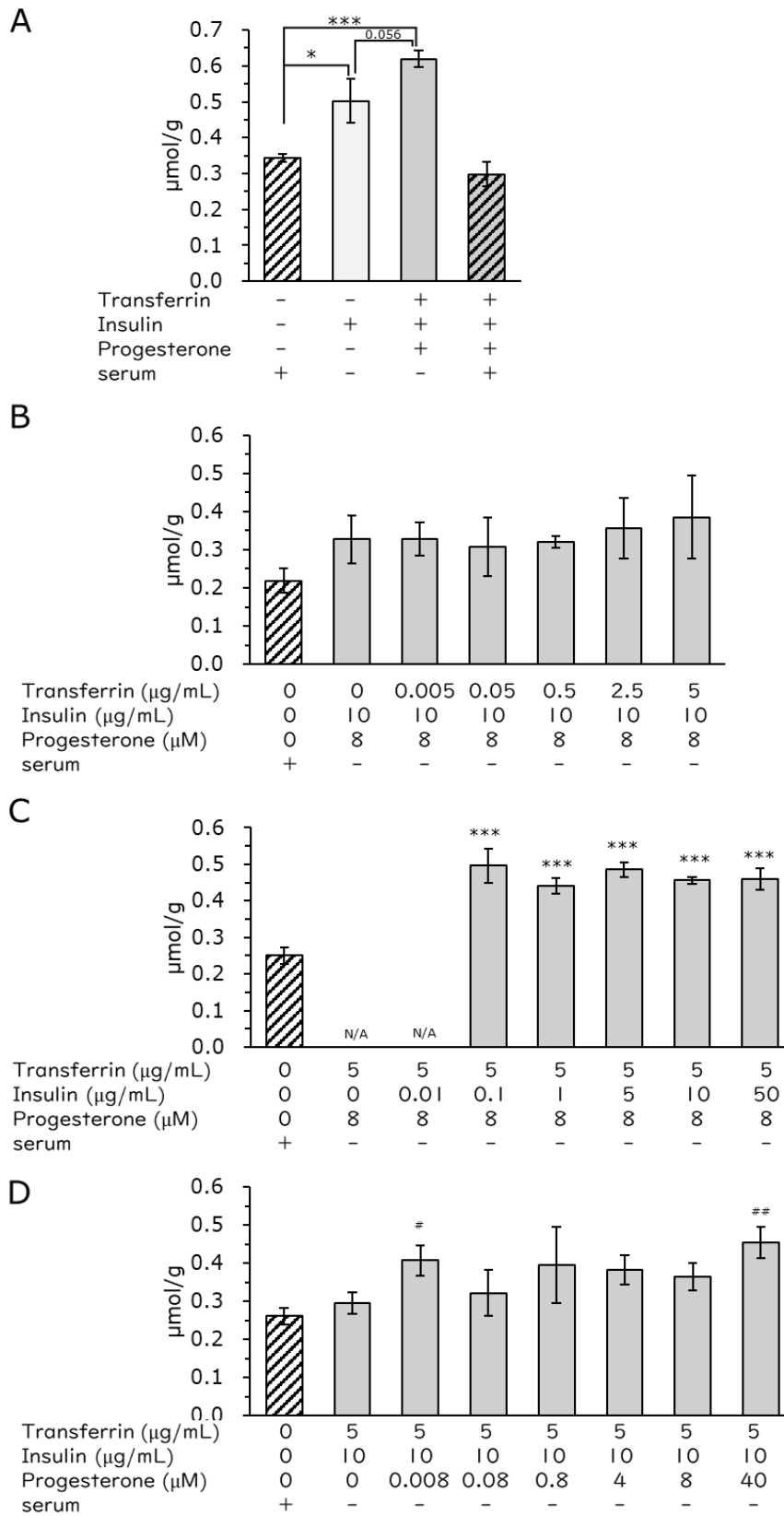


図 12 TIP の各因子の濃度依存性を検討した，タンパク質量で補正した CoQ 量

A: インスリン存在下での、タンパク質量で補正した CoQ 量。斜線は血清存在下であることを表す。灰色は TIP の投与があることを表す。統計的有意差は ANOVA ののち Tukey-Kramer test を用いて決定した。値は平均±SD (n=3)で示した(\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

B: トランスフェリンの濃度のみを変えた CoQ 量。

C: インスリンの濃度のみを変えた CoQ 量。

D: プロゲステロンの濃度のみを変えた CoQ 量。

パネル B~C は、斜線バー: 血清条件下, 灰色バー: 血清無し且つ, 様々な濃度の組み合わせであるが, トランスフェリン・インスリン・プロゲステロンがすべて添加されているサンプルであることを表す。統計的有意差は ANOVA ののち, Tukey-Kramer test または, Williams test を用いて決定した。値は平均±SD (n=3)で示した。\*\*\* $p<0.001$  は 0  $\mu\text{g/mL}$  トランスフェリン, 0  $\mu\text{g/mL}$  インスリン, 0  $\mu\text{M}$  プロゲステロンとの比較であり, ANOVA ののち, Tukey-Kramer test を用いて有意差を決定した。# $p<0.05$ , ## $p<0.01$  は, 5  $\mu\text{g/mL}$  トランスフェリン, 10  $\mu\text{g/mL}$  インスリン, 0  $\mu\text{M}$  プロゲステロンとの比較であり, Williams test を用いて決定した。



### 第3項 細胞内FC量減少因子の探索

どの因子がFC量を減少させるかを特定することを検討した。まずは、1種類の因子のみを投与した場合のFC量の変化を分析した。図13Aに示すように、インスリンのみの投与によってもFC量は減少したが、プロゲステロンとトランスフェリンの追加により、この減少はさらに大きくなった。しかし、この減少は血清条件下では抑制された。

次に、どの因子がFC量を減少させるかを特定するための別の方法として、各因子の濃度依存性を検討した。図13Dに示すように、細胞内FC量はプロゲステロンの濃度依存的に減少した。FC量の低下は、プロゲステロンの添加が影響を与えている可能性がある。しかし、プロゲステロンを添加していない群においてもFC量の低下が観察されていることには、注意する必要がある。以上の結果より、インスリンとトランスフェリンがFC低下効果を示すが、プロゲステロンはFC量に対して濃度依存効果があることを示している。

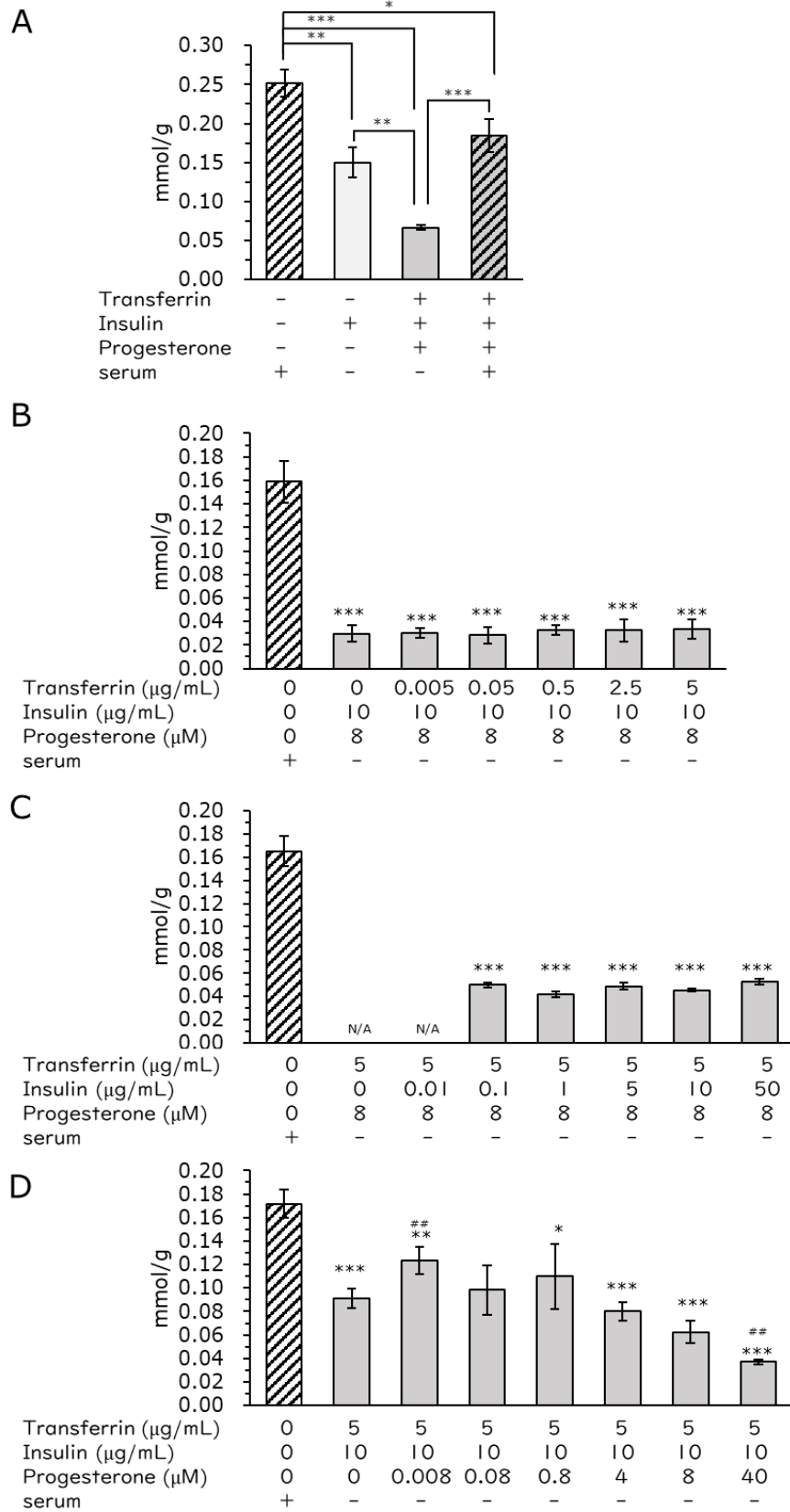


図 13 TIP の各因子の濃度依存性を検討した，タンパク質量で補正した FC 量。

A: インスリン存在下での、タンパク質量で補正した FC 量の測定結果。斜線は血清存在下であることを表す。灰色は TIP の投与があることを表す。統計的有意差は ANOVA ののち Tukey-Kramer test を用いて決定した。値は平均±SD (n=3)で示した(\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ )。

B: トランスフェリンの濃度のみを変えた FC 量。

C: インスリンの濃度のみを変えた FC 量。

D: プロゲステロンの濃度のみを変えた FC 量。

斜線バー: 血清条件下, 灰色バー: 血清無し且つ, 様々な濃度の組み合わせではあるが, トランスフェリン・インスリン・プロゲステロンがすべて添加されているサンプルであることを表す。統計的有意差は ANOVA ののち, Tukey-Kramer test または, Williams test を用いて決定した。値は平均±SD (n=3)で示した。\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  および\*\*\* $p<0.001$  は 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  トランスフェリン, 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリン, 0  $\mu\text{M}$  プロゲステロンとの比較であり, ANOVA ののち, Tukey-Kramer test を用いて有意差を決定した。

## $p<0.01$  は 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  トランスフェリン, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  インスリン, 0  $\mu\text{M}$  プロゲステロンとの比較であり, Williams test を用いて決定した。

#### 第4項 細胞内 CoQ 量増加因子の探索と CoQ 合成酵素の遺伝子発現量

CoQ 量の上昇のメカニズムを解明するために、CoQ 合成酵素遺伝子の遺伝子発現を分析した。図 10B で示すように、CoQ の合成酵素と FC の合成経路は一部共通している。TIP 投与により CoQ 量が増加したため、CoQ 合成酵素の遺伝子の発現量のみを測定した。図 14A に示すように、これらの遺伝子の発現量は TIP 処理によって有意な変化は見られなかった。一方で、図 14B に示すように、メバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素(*HMGCR*)の遺伝子発現量は増加した。メバロン酸経路からコレステロールに合成が進むには、まずファルネシルピロリン酸からスクワレンに合成が進む必要がある。ファルネシルピロリン酸から CoQ の合成経路に進む遺伝子の発現量には変化がなかったことから、コレステロール側に変化があると予測し、ファルネシルピロリン酸からスクワレンへ合成が進むスクワレン合成酵素(*FDFT1*)の遺伝子発現量を測定した。結果、*FDFT1* の発現量は増加していた。

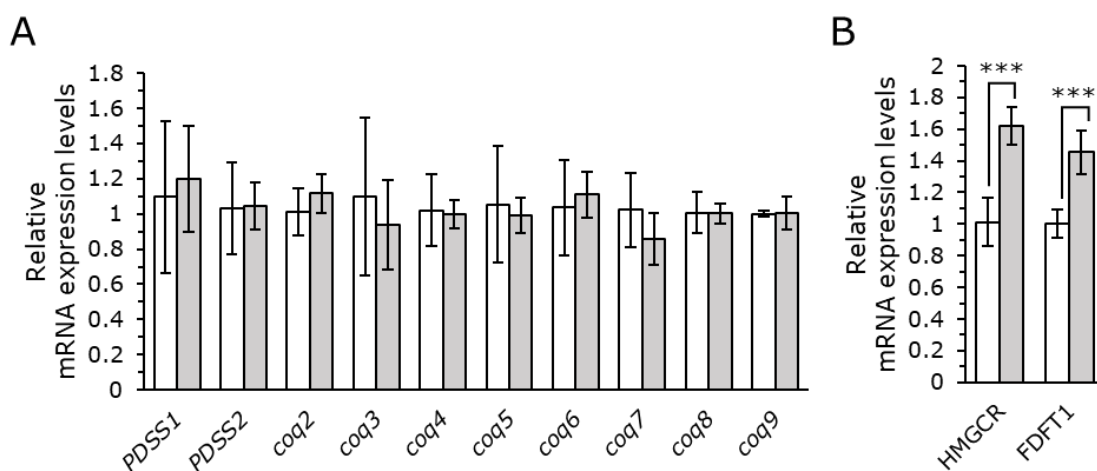


図 14 CoQ 合成酵素と HMG-CoA 還元酵素およびスクワレン合成酵素の遺伝子発現量  
A: CoQ 合成酵素遺伝子発現量.

B: メバロン酸経路側の HMG-CoA 還元酵素およびスクワレン合成酵素の遺伝子発現量.

白色バー: TIP 無し, 灰色バー: TIP4 日間投与を表す. 各遺伝子は GAPDH の遺伝子発現量で補正した. 統計的有意差は Student's t test を用いて決定した. 値は平均±SD (n=3) で示した(\*\*\*) $p < 0.001$ ).

### 第5項 CoQ 量低下細胞モデルへの TIP 投与

CoQ 量が低下している細胞へ、TIP の投与が CoQ 増加に有用であるかを確認するために、CoQ 量低下細胞モデルに対し、TIP の投与を行った。CoQ の合成を阻害するために 4-NB を阻害剤として使用した。図 15A に示すように、4-NB 処理細胞への TIP の添加も細胞の CoQ 量を増加させたが、この増加は NGF(-)TIP(-)4-NB(-)の細胞に対する NGF(-)TIP(+)-4-NB(-)の細胞内 CoQ 量の増加と比較して低かった。NGF(+)-TIP(-)-4-NB(+)-処理をした細胞の CoQ 量は、NGF(+)-TIP(-)-4-NB(-)の処理細胞に比べて低かった。一方、FC 量は、TIP の投与後、NGF(-)TIP(-)-4-NB(-)および NGF(-)TIP(-)-4-NB(+)-の両方で減少した(図 15B)。

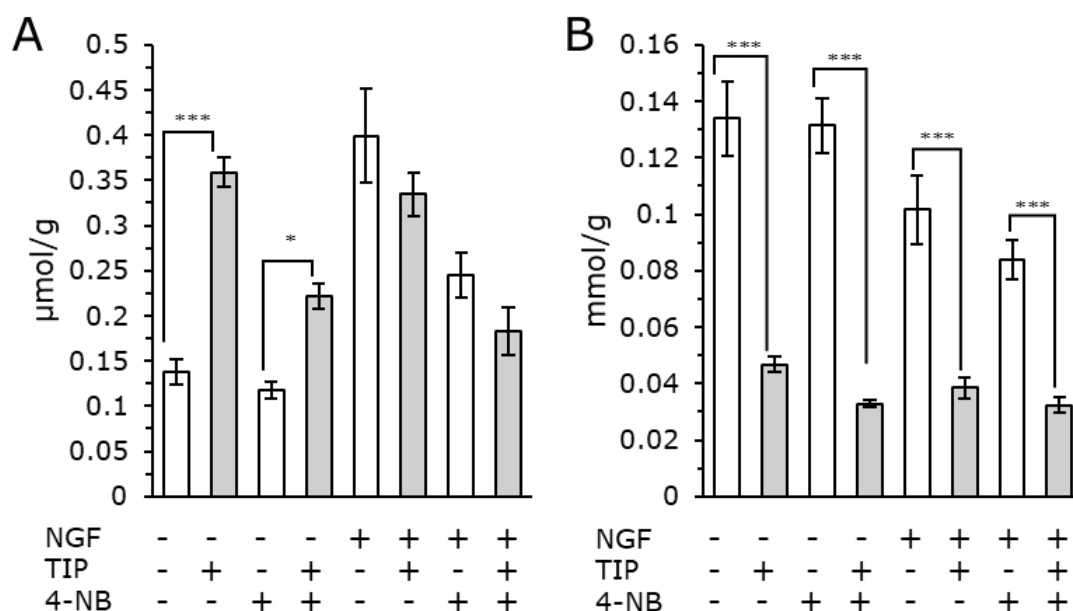


図 15 4-NB 投与 PC12 細胞への TIP 投与効果

A: タンパク質量で補正した CoQ 量, B: タンパク質量で補正した FC 量. 白色バーは TIP を投与していないことを表し, 灰色バーは TIP が投与されていることを表す. 統計的有意差は ANOVA ののち, Tukey-Kramer test を用いて決定し, 値は平均±SD (n=3)で示した (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  および \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 第4節 考察

TIP は神経細胞を培養する培地に添加され、様々な効果を発揮する。例えば、神経突起の延伸の補助である。本章では TIP が細胞内 CoQ 量を維持することを見出した。これは、神経細胞培養時における TIP 投与の重要な効果の一つである可能性がある。

図 10 で示したように、TIP は未分化 PC12 細胞の細胞内 CoQ 量を増加させた。TIP のうち、どの因子が CoQ 量の増加にかかわっているかを検討した結果では、図 12 で示したように、インスリンのみの投与においても、PC12 細胞内 CoQ 量の増加が観察された。さらにプロゲステロンとトランスフェリンの投与は、インスリンのみの投与に比べて、細胞内 CoQ 量の増加を促進する傾向が見られた。TIP のうち、1 つの因子のみの濃度を変化させて細胞内 CoQ 量を分析した結果では、図 12D で示したように、プロゲステロンが CoQ 量増加に関わっており、トランスフェリンは CoQ 量増加に関しては無関係である可能性が高い。

TIP による CoQ 増加のメカニズムを調べるために、CoQ 合成酵素の遺伝子の発現量を調べたが、これには変化が見られなかった(図 14A)。このことは TIP が CoQ 合成酵素量に直接の関与はしていない可能性がある。ただし、CoQ の分解の機能についてはほとんどわかっておらず、TIP が CoQ の分解を阻害している可能性は否定できない。さらに、CoQ 合成酵素は CoQ-complex と呼ばれる複合体を形成し、CoQ を効率的に合成していることが示唆されている<sup>(41)</sup>。もう一つの仮説として、TIP が CoQ-complex の形成に影響を与え、CoQ 量を変動させた可能性も否定できない。

インスリンのみの投与においても CoQ 量が増加したことについては、インスリンは CoQ 生合成にも関わる HMG-CoA 還元酵素を亢進させる<sup>(113)</sup>ことが理由であると考察する。実際、図 14B において、*HMGCR* 遺伝子発現量が増加していた。また、メバロン酸経路のファルネシルピロリン酸からコレステロール合成に進む経路にいる、スクワレンシンターゼの遺伝子(*FDFT1*)発現量も増加していたことから、コレステロール代謝が亢進されていることが示唆された。しかし、プロゲステロンはラノステロールより後の段階でコレステロール合成を阻害する<sup>(127-129)</sup>ことが報告されていることから、コレステロールの中間代謝物が増加していることが示唆された。コレステロールは HMG-CoQ 還元酵素を抑制する負のフィードバックを引き起こす<sup>(154, 155)</sup>。インスリンのみの投与でも CoQ 量が増加したが、TIP すべて投与されていた場合にさらに CoQ の増加傾向があったことは、インスリンを介したメバロン酸経路の活性化と、プロゲステロンによりコレステロール合成が抑えられることから、メバロン酸経路の基質量が増加し、結果として CoQ 量が増加した可能性がある。

TIP の投与は、CoQ と経路を一部共通に持つ FC 量の減少も示した(図 10C, D)。図 13A で示したように、インスリンのみの投与によっても、若干の FC 量の減少を観察した。TIP のうち、プロゲステロンが、4-40  $\mu$ M 投与時において、PC12 細胞の FC 量を抑制することを見出した(図 13D)。図 14B で示したように、TIP 投与により HMGCR や

FDFT1 の遺伝子発現量が増加していたことを考えると、インスリンのみの投与において、つまり、プロゲステロン投与なしに、FC が減少した理由については不明である。プロゲステロン存在下での FC 量減少については、これまでに、Metherall らによって CHO-7 細胞へのプロゲステロンの投与が細胞内コレステロール量を低下させ、ラノステロールの蓄積を増加したことが報告されていることや<sup>(128, 129)</sup>、HepG2, CHO, Hela および Caco-2 細胞でも観察されることも報告していることから<sup>(128)</sup>、同様のメカニズムで FC 量が減少したと考えられる。しかし、これまでに神経細胞においての報告はされておらず、神経細胞においてもプロゲステロンが FC 量の合成を抑制することは、本研究において新たに発見したことである。

脳には最も多くのコレステロールが存在する<sup>(83)</sup>。コレステロールの恒常性は細胞機能および代謝に必須である。成人の脳におけるコレステロールの約 70~80% は、ニューロンとアストロサイトの細胞質部分に存在し、細胞の形態に影響を与え、細胞表面の受容体を安定化し、シナプス伝達を調節する<sup>(84)</sup>。コレステロールは神経突起の伸長、シナプスの形成、神経伝達物質の放出に必要な新しい膜の形成に不可欠であり、神経細胞の分化と成熟に重要な役割を担っている<sup>(85-88)</sup>。一方で、メバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の阻害による神経突起の喪失は、コレステロールの減少ではなく、セラニルセラニルピロリン酸が神経突起の伸長または維持に重要であると報告された<sup>(156)</sup>。TIP の投与により FC 量の減少が示されたが、これによる神経分化や神経突起伸長への影響は低いと考えられる。HMG-CoA 還元酵素の阻害は、CoQ 合成量も減少させるが、この報告では CoQ については言及されていない。

プロゲステロンには損傷後の神経保護効果が報告されている。例えば、マウスの脳に外傷を与えた後、32 mg/kg のプロゲステロンを投与したところ、プロゲステロンを与えなかったマウスに比べ、損傷部位を囲う皮質のアポトーシスが減少し、障害による炎症サイトカインの上昇を抑制した<sup>(157)</sup>。神経圧挫損傷モデルラット(軸索とミエリンを完全に中断するモデル)へのプロゲステロン投与による神経保護効果を報告した論文では、プロゲステロンは 1 mg/200  $\mu$ L を皮下注射にて投与された。プロゲステロンが海馬細胞の脂質過酸化を減少させた報告では 10  $\mu$ M 投与していた<sup>(158)</sup>。これら投与濃度は、本研究で用いた濃度よりも高い濃度であるか、同程度の濃度である。

血清条件下では TIP の投与効果(CoQ 量増加, FC 量低下)が見られなかったことを図 12A および図 13A で示した。血清中に含まれるタンパク質は、プロゲステロンと結合することが報告されている<sup>(159, 160)</sup>。ステロイドはステロイド産生細胞が放出されると、アルブミンや、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)、コルチコステロイド結合グロブリンによって血中へ輸送される。特に、すべての哺乳動物は、性腺および生殖管の発達の重要な段階で血漿 SHBG を産生する。ヒト血中では思春期が進むにつれて SHBG が低下することにより、性ステロイドの早期作用を制限していると考えられている。本研究ではウシ胎児血清とウマ血清を用いているため、血清中に SHBG が含まれている可能性が高く、本研究にお

けるプロゲステロン投与濃度では、血清中の SHBG と結合してしまい、細胞内へ取り込まれなかった可能性が推測される。血清条件下において、さらに高濃度の TIP の投与により、無血清条件下と同様の結果が得られる可能性がある。

培地からの血清除去は、神経細胞の分化にとって重要な刺激である。例えば N1E-115 細胞では、培地から除去することで神経突起を伸長させる<sup>(161)</sup>。PC12 細胞では、血清除去では細胞が死滅したため、血清除去のみの効果を調べることは困難である。PC12 細胞は血清除去によりアポトーシスが誘導されることが報告されている<sup>(162)</sup>。血清条件下でのアポトーシス誘導時に細胞内 CoQ 量が増加するかを測定すること、無血清条件下でアポトーシス阻害試薬を投与することにおいて細胞内 CoQ 量が増加するかを調べることで、本研究における CoQ 量増加が、血清除去によることかがどうか調べられる可能性がある。血清中のタンパク質が TIP 投与による効果をキャンセルしているとするならば、血清濃度を 2% にして培養することも検討項目の一つである。ただし、低血清培養においても、細胞の生存率の低下は確認される<sup>(163)</sup>ため、アポトーシス阻害試薬などは行う必要があると考えられる。

CoQ 量は加齢とともに低下することが報告されている<sup>(74)</sup>が、メカニズムは不明である。インスリン量も加齢とともに変化することが報告されている<sup>(164)</sup>。インスリン受容体の活性化に伴うシグナル伝達も年齢と主に減少し<sup>(165,166)</sup>、プロゲステロン量は加齢や閉経とともに<sup>(167)</sup>、特に女性で大きく減少する。また、加齢とともにトランスフェリン受容体が減少することも報告されている<sup>(168)</sup>。まとめると、これらの効果が CoQ 量の加齢に伴う変化に関与している可能性がある。

CoQ 合成酵素欠損症に関連する病態の中で、多くの神経疾患が報告されている<sup>(44,47,50,51)</sup>。CoQ の投与はこれらの疾患に有益であると考えられるが、経口投与された CoQ は脳にはほとんど取り込まれない<sup>(81)</sup>。ゆえに経口サプリメント以外での方法で細胞内 CoQ 量を増加する方法を開発する必要がある。

図 15 で示したように、未分化 PC12 細胞は CoQ 合成阻害剤 4-NB 存在下においても、TIP の投与により CoQ 量が増加した。NGF 存在下では TIP の投与による CoQ の増加は見られなかったが、図 10 において NGF と TIP の同時投与が CoQ 量増加に対し相加効果を示さなかったことと同じであると推察した。しかし、第 2 章の図 7 で示したように、CoQ 量を低下させた PC12 細胞への NGF 投与は、分化マーカー遺伝子発現量を低下させ、神経突起長を減少させた。CoQ 量の合成が阻害されている神経細胞に対して、あらかじめ TIP により CoQ 量を増加させておくことは、この細胞を分化させた際に、分化マーカーの遺伝子発現量の減少を抑え、神経突起長延伸の短縮を抑制する可能性がある。

本章では、CoQ 合成阻害剤を用いた CoQ 量低下細胞モデルに TIP の投与を行ったところ、この細胞内 CoQ 量が増加した。PC12 細胞におけるこの結果が、動物モデルに対する TIP 投与によって、脳内 CoQ 量が増加することが確認された場合、TIP の投与が、CoQ 量が低下している神経疾患に対して有用である可能性がある。



## 第4章 結語

CoQ は生体内で合成される脂質であるが、加齢や、疾患において減少する。また、CoQ 合成酵素の遺伝子変異により、神経疾患が発症する例も報告されていることから、神経系における CoQ の役割について着目されている。CoQ はミトコンドリアにおける ATP 産生に必須の因子の一つである。神経細胞が神経突起を伸長させ、神経回路網を形成するためには、ミトコンドリアが神経突起の末端に移動し、そこで ATP が産生される必要がある。このことは、CoQ 量が十分に存在することが、神経細胞にとって重要であると考えられる。よって本研究では神経細胞と CoQ に着目した。

第2章では、神経細胞様への分化過程について検討した。主として神経細胞モデルとしてよく知られている PC12 細胞を用いた。PC12 細胞は神経成長因子(NGF)を投与することにより、細胞の形態を変え、交感神経様に分化する。この過程の前後の細胞内 CoQ 量を比較した。結果、分化後に CoQ 量が劇的に増加した。NGF の投与期間に比例し、CoQ が増加していることも確認した。ミトコンドリア内 CoQ 量も増加していた。CoQ 量のメカニズムを解明するために、まず CoQ 合成酵素の遺伝子発現量を測定したが、これには差が見られなかった。次に、分化による CoQ 量増加の生理的意義の解明のために、CoQ 量を低下させた細胞モデルを作成した。CoQ 量を低下させる試薬として、CoQ 合成酵素の一つである *coq2* に対し競合阻害する試薬である 4-ニトロ安息香酸(4-NB)を用いた。*COQ2* 変異の神経疾患の発症までに長い年月があることから、4-NB の投与は一過性ではなく、長期間(11ヶ月)投与した。この長期間 CoQ 量を低下させた細胞モデルに NGF を投与し分化させたところ、神経突起伸長に関わる分化マーカーである GAP-43 や、ドーパミン作動性ニューロンへの分化の指標である TH の遺伝子発現量が低下し、細胞の神経突起長が短くなっていることを見出した。CoQ は神経細胞が分化する際の、特に神経突起伸長に影響を与えている可能性がある。

CoQ の欠乏が分化に影響を与えていることから、細胞内 CoQ 量を増やすことが重要である。CoQ はサプリメントとしても用いられる試薬であるが、CoQ は血中から脳へは到達しにくい。そこで第3章では、CoQ 投与以外の方法での細胞内 CoQ 量増加因子について探索した。着目したのは、TIP である。TIP は、これを含む無血清培地が、さまざまな神経系組織からの細胞の培養に有用であることが示されている。この TIP を PC12 細胞に投与した。未分化の PC12 細胞への TIP 投与は細胞内 CoQ 量を増加させ、FC 量を抑制した。中でも FC 量はプロゲステロンの用量依存的に抑制されることを見出した。インスリンのみの投与においても、PC12 細胞内 CoQ 量の増加が観察されたが、トランスフェリンとプロゲステロンの両方を投与したほうが、細胞内 CoQ 量の増加を促進する傾向が見られた。TIP による CoQ 増加のメカニズムを調べるために、CoQ 合成酵素の遺伝子の発現量を調べたが、これには変化が見られなかった。

本研究において、神経細胞が分化する際に細胞内 CoQ 量が増加することを発見した。そして、神経細胞内 CoQ の減少が、神経突起の伸長を妨げることを見出した。

脳の萎縮はこれまで神経細胞の細胞死であると考えられてきたが、近年、神経突起長の減少も脳が萎縮する原因の一つであると報告された。加えて、*COQ2* 遺伝子に変異を持つ患者から作製された iPS 細胞をニューロンに分化させた報告では、神経突起タンパク質である TAU が減少していた。本研究の結果より CoQ の欠乏が神経突起の伸長に関与していることから、細胞内 CoQ 量を増やすことは、神経突起長の減少における症例の改善に有用である可能性がある。

一方で、CoQ の減少が報告されているパーキンソン病や多系統萎縮症や、モデル動物では CoQ 投与により改善報告のあったアルツハイマー病やハンチントン病の患者への CoQ 投与を行った臨床実験では、有意な差を持って回復した例はほとんどない。その理由の一つとして血液脳関門(BBB)の存在がある。CoQ は BBB を通過しにくく、CoQ の投与に寄らない、細胞内 CoQ 量を増加させる因子が必要である。本研究では神経細胞培養サプリメントにも含まれている物質である TIP の投与が、細胞内 CoQ 量を増加させたことも発見した。

神経細胞の分化時においても、TIP の投与においても細胞内 CoQ 量が増加したことが示された。しかし、どちらの場合においてもミトコンドリアに局在する CoQ 合成酵素の最終ステップの遺伝子(*coq1~coq9*)の発現量には変化が見られなかったことから、CoQ 量増加メカニズムについては未解決である。TIP の投与による CoQ 量の増加は、インスリンやプロゲステロンによりメバロン酸経路を亢進したためと予測されるが、NGF による CoQ の増加も同様であるかは不明である。ミトコンドリアに局在する CoQ 合成酵素は CoQ-synthome と呼ばれる複合体を形成し、CoQ 合成を効率化していることが示唆されている。神経細胞のニューロンへの分化は代謝を変化させることから、CoQ 合成に関連する CoQ-synthome の形成量にも変化させている可能性がある。また、CoQ は主にミトコンドリアで行われているが、ゴルジ体や小胞体においても合成されていることが報告されており、これら細胞小器官での CoQ 合成が亢進されている可能性も否定できない。

細胞内 CoQ 量増加メカニズムに関しては不明な点が残されているが、TIP の投与により CoQ 量低下細胞モデルの細胞内 CoQ 量も増加させたことは確かである。TIP は BBB を通過することが報告されている。このため、TIP による CoQ 増加効果が、CoQ の欠乏が報告されている神経疾患に対し有用な効果を示すことが期待される。

## 参考文献

- 1 厚生労働省. 患者調査.
- 2 Dai L, Zhou H, Xu X, Zuo Z. Brain structural and functional changes in patients with major depressive disorder: a literature review. *PeerJ*2019; **7**: e8170.
- 3 Nazarova A, Schmidt M, Cooney J, Uher R. Neural markers of familial risk for depression - A systematic review. *Dev Cogn Neurosci*2022; **58**: 101161.
- 4 Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*2000; **80**: 315-360.
- 5 Wolf DE, Hoffman CH, Trenner NR, *et al*. COENZYME Q. I. STRUCTURE STUDIES ON THE COENZYME Q GROUP. *Journal of the American Chemical Society*1958; **80**: 4752-4752.
- 6 Festenstein GN, Heaton FW, Lowe JS, Morton RA. A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids ( $\lambda$  max. 272 m  $\mu$ ). *Biochem J*1955; **59**: 558-566.
- 7 Crane FL, Hatefi Y, Lester RL, Widmer C. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*1957; **25**: 220-221.
- 8 Morton RA. Ubiquinone. *Nature*1958; **182**: 1764-1767.
- 9 Lester RL, Crane FL, Hatefi Y. COENZYME Q: A NEW GROUP OF QUINONES1. *Journal of the American Chemical Society*1958; **80**: 4751-4752.
- 10 Page AC, Jr., Gale P, Wallick H, *et al*. Coenzyme Q. 17. Isolation of coenzyme Q10 from bacterial fermentation. *Arch Biochem Biophys*1960; **89**: 318-321.
- 11 Threlfall DR, Whistance GR. Isolation of ubiquinone-11 and ubiquinone-12 from green peppers. *Biochem J*1969; **113**: 38p-39p.
- 12 Karr DE, Bibb WF, Moss CW. Isoprenoid quinones of the genus *Legionella*. *J Clin Microbiol*1982; **15**: 1044-1048.
- 13 Okamoto M, Nakamura A, Maeda A, *et al*. Coenzyme Q10 levels increase with embryonic development in medaka. *J Clin Biochem Nutr*2022; **70**: 231-239.
- 14 López-Lluch G, Rodríguez-Aguilera JC, Santos-Ocaña C, Navas P. Is coenzyme Q a key factor in aging? *Mech Ageing Dev*2010; **131**: 225-235.
- 15 Mitchell P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett*1975; **59**: 137-139.
- 16 Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo j*2000; **19**: 1777-1783.
- 17 Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*2008; **32**: 529-539.
- 18 Takayanagi R, Takeshige K, Minakami S. NADH- and NADPH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. Dependence on the rate of

- electron flow in the respiratory chain and an antioxidant role of ubiquinol. *Biochem J* 1980; **192**: 853-860.
- 19 Marubayashi S, Dohi K, Ezaki H, Hayashi K, Kawasaki T. Preservation of ischemic rat liver mitochondrial functions and liver viability with CoQ10. *Surgery* 1982; **91**: 631-637.
- 20 Marubayashi S, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T. Changes in the levels of endogenous coenzyme Q homologs, alpha-tocopherol, and glutathione in rat liver after hepatic ischemia and reperfusion, and the effect of pretreatment with coenzyme Q10. *Biochim Biophys Acta* 1984; **797**: 1-9.
- 21 Yamamoto Y, Komuro E, Niki E. Antioxidant activity of ubiquinol in solution and phosphatidylcholine liposome. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1990; **36**: 505-511.
- 22 Mellors A, Tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem* 1966; **241**: 4353-4356.
- 23 Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1660**: 171-199.
- 24 Yamashita S, Yamamoto Y. Simultaneous detection of ubiquinol and ubiquinone in human plasma as a marker of oxidative stress. *Anal Biochem* 1997; **250**: 66-73.
- 25 Sohmiya M, Tanaka M, Tak NW, *et al.* Redox status of plasma coenzyme Q10 indicates elevated systemic oxidative stress in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2004; **223**: 161-166.
- 26 Sohmiya M, Tanaka M, Suzuki Y, Tanino Y, Okamoto K, Yamamoto Y. An increase of oxidized coenzyme Q-10 occurs in the plasma of sporadic ALS patients. *J Neurol Sci* 2005; **228**: 49-53.
- 27 Momose K, Rudney H. 3-Polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from p-hydroxybenzoate and isopentenylpyrophosphate. A demonstration of isoprenoid synthesis in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1972; **247**: 3930-3940.
- 28 Villalba JM, Navas P. Regulation of coenzyme Q biosynthesis pathway in eukaryotes. *Free Radic Biol Med* 2021; **165**: 312-323.
- 29 Turunen M, Swiezewska E, Chojnacki T, Sindelar P, Dallner G. Regulatory aspects of coenzyme Q metabolism. *Free Radic Res* 2002; **36**: 437-443.
- 30 Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q--biosynthesis and functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **396**: 74-79.
- 31 Stefely JA, Pagliarini DJ. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 2017; **42**: 824-843.
- 32 Jeske DJ, Dietschy JM. Regulation of rates of cholesterol synthesis in vivo in the liver and carcass of the rat measured using [3H]water. *J Lipid Res* 1980; **21**: 364-376.
- 33 Kawamukai M. Biosynthesis and applications of prenylquinones. *Biosci Biotechnol*

- Biochem* 2018; **82**: 963-977.
- 34 Young IG, Leppik RA, Hamilton JA, Gibson F. Biochemical and genetic studies on ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12:4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase. *J Bacteriol* 1972; **110**: 18-25.
- 35 Quinzii C, Naini A, Salviati L, *et al.* A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2006; **78**: 345-349.
- 36 Hayashi K, Ogiyama Y, Yokomi K, Nakagawa T, Kaino T, Kawamukai M. Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. *PLoS One* 2014; **9**: e99038.
- 37 Johnson A, Gin P, Marbois BN, *et al.* COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 31397-31404.
- 38 Hsieh EJ, Gin P, Gulmezian M, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch Biochem Biophys* 2007; **463**: 19-26.
- 39 Ashraf S, Gee HY, Woerner S, *et al.* ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest* 2013; **123**: 5179-5189.
- 40 He CH, Xie LX, Allan CM, Tran UC, Clarke CF. Coenzyme Q supplementation or over-expression of the yeast Coq8 putative kinase stabilizes multi-subunit Coq polypeptide complexes in yeast coq null mutants. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1841**: 630-644.
- 41 Acosta MJ, Vazquez Fonseca L, Desbats MA, *et al.* Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1857**: 1079-1085.
- 42 Andersson M, Elmberger PG, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Rates of cholesterol, ubiquinone, dolichol and dolichyl-P biosynthesis in rat brain slices. *FEBS Lett* 1990; **269**: 15-18.
- 43 Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 2379-2382.
- 44 López LC, Schuelke M, Quinzii CM, *et al.* Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* 2006; **79**: 1125-1129.
- 45 Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, *et al.* Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest* 2007; **117**: 765-772.
- 46 Diomedi-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, *et al.* COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc*

- Nephrol*2007; **18**: 2773-2780.
- 47 Jun M, Takashi M, I H. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 2013; **369**: 233-244.
- 48 Salviati L, Trevisson E, Rodriguez Hernandez MA, *et al*. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J Med Genet* 2012; **49**: 187-191.
- 49 Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, *et al*. COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest* 2011; **121**: 2013-2024.
- 50 Lagier-Tourenne C, Tazir M, López LC, *et al*. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 661-672.
- 51 Mollet J, Delahodde A, Serre V, *et al*. CABP1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 623-630.
- 52 Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Meunier B, *et al*. A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 2009; **84**: 558-566.
- 53 Sugiyama T, Murao N, Kadowaki H, *et al*. ERAD components Derlin-1 and Derlin-2 are essential for postnatal brain development and motor function. *iScience* 2021; **24**: 102758.
- 54 Monzio Compagnoni G, Kleiner G, Samarani M, *et al*. Mitochondrial Dysregulation and Impaired Autophagy in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons of Multiple System Atrophy. *Stem Cell Reports* 2018; **11**: 1185-1198.
- 55 Davie CA. A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull* 2008; **86**: 109-127.
- 56 Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF. Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 1997; **42**: 261-264.
- 57 Hargreaves IP, Lane A, Sleiman PM. The coenzyme Q10 status of the brain regions of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2008; **447**: 17-19.
- 58 Isobe C, Murata T, Sato C, Terayama Y. Increase of oxidized/total coenzyme Q-10 ratio in cerebrospinal fluid in patients with Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 2007; **14**: 340-343.
- 59 Mischley LK, Allen J, Bradley R. Coenzyme Q10 deficiency in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2012; **318**: 72-75.
- 60 Strijks E, Kremer HP, Horstink MW. Q10 therapy in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Mol Aspects Med* 1997; **18 Suppl**: S237-240.
- 61 Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, *et al*. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol* 2002; **59**: 1541-1550.
- 62 Cammisuli DM, Cipriani G, Giusti EM, Castelnuovo G. Effects of Reminiscence Therapy

- on Cognition, Depression and Quality of Life in Elderly People with Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Clin Med* 2022; **11**.
- 63 McDonald SR, Sohal RS, Forster MJ. Concurrent administration of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radic Biol Med* 2005; **38**: 729-736.
- 64 Yang X, Yang Y, Li G, Wang J, Yang ES. Coenzyme Q10 attenuates beta-amyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation. *J Mol Neurosci* 2008; **34**: 165-171.
- 65 Yamagishi K, Ikeda A, Moriyama Y, *et al*. Serum coenzyme Q10 and risk of disabling dementia: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Atherosclerosis* 2014; **237**: 400-403.
- 66 Galasko DR, Peskind E, Clark CM, *et al*. Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Arch Neurol* 2012; **69**: 836-841.
- 67 Vonsattel JP, DiFiglia M. Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; **57**: 369-384.
- 68 Kasparová S, Sumbalová Z, Bystrický P, *et al*. Effect of coenzyme Q10 and vitamin E on brain energy metabolism in the animal model of Huntington's disease. *Neurochem Int* 2006; **48**: 93-99.
- 69 Feigin A, Kieburtz K, Como P, *et al*. Assessment of coenzyme Q10 tolerability in Huntington's disease. *Mov Disord* 1996; **11**: 321-323.
- 70 Group HS. A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 2001; **57**: 397-404.
- 71 Gilman S, Wenning GK, Low PA, *et al*. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008; **71**: 670-676.
- 72 Mitsui J, Koguchi K, Momose T, *et al*. Three-Year Follow-Up of High-Dose Ubiquinol Supplementation in a Case of Familial Multiple System Atrophy with Compound Heterozygous COQ2 Mutations. *Cerebellum* 2017; **16**: 664-672.
- 73 Wang Y, Hekimi S. The efficacy of coenzyme Q(10) treatment in alleviating the symptoms of primary coenzyme Q(10) deficiency: A systematic review. *J Cell Mol Med* 2022; **26**: 4635-4644.
- 74 Kalén A, Appelkvist EL, Dallner G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* 1989; **24**: 579-584.
- 75 Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem* 1990; **54**: 415-423.
- 76 Edlund C, Söderberg M, Kristensson K, Dallner G. Ubiquinone, dolichol, and cholesterol metabolism in aging and Alzheimer's disease. *Biochem Cell Biol* 1992; **70**: 422-428.
- 77 Deichmann R, Lavie C, Andrews S. Coenzyme q10 and statin-induced mitochondrial

- dysfunction. *Ochsner J*2010; **10**: 16-21.
- 78 Ramachandran R, Wierzbicki AS. Statins, Muscle Disease and Mitochondria. *J Clin Med* 2017; **6**.
- 79 Tomono Y, Hasegawa J, Seki T, Motegi K, Morishita N. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1986; **24**: 536-541.
- 80 Bentinger M, Dallner G, Chojnacki T, Swiezewska E. Distribution and breakdown of labeled coenzyme Q10 in rat. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**: 563-575.
- 81 Yuzuriha T, Takada M, Katayama K. Transport of [<sup>14</sup>C]coenzyme Q10 from the liver to other tissues after intravenous administration to guinea pigs. *Biochim Biophys Acta* 1983; **759**: 286-291.
- 82 Moutinho M, Nunes MJ, Rodrigues E. The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Exp Cell Res* 2017; **360**: 55-60.
- 83 Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 806-815.
- 84 Colardo M, Martella N, Pensabene D, *et al.* Neurotrophins as Key Regulators of Cell Metabolism: Implications for Cholesterol Homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021; **22**.
- 85 Goritz C, Mauch DH, Pfrieder FW. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci* 2005; **29**: 190-201.
- 86 Takamori S, Holt M, Stenius K, *et al.* Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 2006; **127**: 831-846.
- 87 Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, *et al.* Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci* 2007; **27**: 6417-6427.
- 88 Colardo M, Petraroia M, Lerza L, *et al.* NGF Modulates Cholesterol Metabolism and Stimulates ApoE Secretion in Glial Cells Conferring Neuroprotection against Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 2022; **23**.
- 89 Vance JE, Hayashi H, Karten B. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 193-212.
- 90 Block RC, Dorsey ER, Beck CA, Brenna JT, Shoulson I. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. *J Clin Lipidol* 2010; **4**: 17-23.
- 91 Di Paolo G, Kim TW. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci* 2011; **12**: 284-296.
- 92 Wang Q, Yan J, Chen X, *et al.* Statins: multiple neuroprotective mechanisms in neurodegenerative diseases. *Exp Neurol* 2011; **230**: 27-34.
- 93 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; **290**: 457-465.



- 94 Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1410**: 103-123.
- 95 Raffaello A, Mammucari C, Gherardi G, Rizzuto R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends Biochem Sci* 2016; **41**: 1035-1049.
- 96 Csordás G, Weaver D, Hajnóczky G. Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends Cell Biol* 2018; **28**: 523-540.
- 97 Letts JA, Fiedorczuk K, Sazanov LA. The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature* 2016; **537**: 644-648.
- 98 Baertling F, Sánchez-Caballero L, van den Brand MAM, *et al.* NDUFAF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. *Eur J Hum Genet* 2017; **25**: 1273-1277.
- 99 Novack GV, Galeano P, Castaño EM, Morelli L. Mitochondrial Supercomplexes: Physiological Organization and Dysregulation in Age-Related Neurodegenerative Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; **11**: 600.
- 100 Seager R, Lee L, Henley JM, Wilkinson KA. Mechanisms and roles of mitochondrial localisation and dynamics in neuronal function. *Neuronal Signal* 2020; **4**: Ns20200008.
- 101 Fukumitsu K, Fujishima K, Yoshimura A, Wu YK, Heuser J, Kengaku M. Synergistic action of dendritic mitochondria and creatine kinase maintains ATP homeostasis and actin dynamics in growing neuronal dendrites. *J Neurosci* 2015; **35**: 5707-5723.
- 102 Do Rego JL, Seong JY, Burel D, *et al.* Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol* 2009; **30**: 259-301.
- 103 Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, *et al.* Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27**: 402-409.
- 104 Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 2013; **379**: 62-73.
- 105 Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 2011; **32**: 81-151.
- 106 Bottenstein JE, Sato GH. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; **76**: 514-517.
- 107 Messer A, Mazurkiewicz JE, Maskin P. Growth of dissociated rat cerebellar cells using serum-free supplemented media and varied transferrin concentrations. *Cell Mol Neurobiol* 1981; **1**: 99-114.
- 108 Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and

- neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2014; **13**: 1045-1060.
- 109 Tarangelo A, Dixon SJ. Nanomedicine: An iron age for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2016; **11**: 921-922.
- 110 Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, *et al*. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell* 2017; **171**: 273-285.
- 111 Simpson IA, Ponnuru P, Klinger ME, *et al*. A novel model for brain iron uptake: introducing the concept of regulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; **35**: 48-57.
- 112 Harris IR, Höppner H, Siefken W, Farrell AM, Wittern KP. Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; **114**: 83-87.
- 113 Xiao X, Luo Y, Peng D. Updated Understanding of the Crosstalk Between Glucose/Insulin and Cholesterol Metabolism. *Front Cardiovasc Med* 2022; **9**: 879355.
- 114 Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Jr., Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 1999; **848**: 114-123.
- 115 Zhao W, Chen H, Xu H, *et al*. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 1999; **274**: 34893-34902.
- 116 Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, *et al*. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 2004; **29**: 1326-1334.
- 117 de la Monte SM. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2012; **9**: 35-66.
- 118 Sędzikowska A, Szablewski L. Insulin and Insulin Resistance in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2021; **22**.
- 119 Margolis RU, Altszuler N. Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* 1967; **215**: 1375-1376.
- 120 Dorn A, Bernstein HG, Rinne A, Ziegler M, Hahn HJ, Ansorge S. Insulin- and glucagonlike peptides in the brain. *Anat Rec* 1983; **207**: 69-77.
- 121 Giatti S, Caruso D, Boraso M, *et al*. Neuroprotective effects of progesterone in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroendocrinol* 2012; **24**: 851-861.
- 122 Garay L, Gonzalez Deniselle MC, Meyer M, *et al*. Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2009; **1283**: 177-185.
- 123 Garay L, Gonzalez Deniselle MC, Lima A, Roig P, De Nicola AF. Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; **107**: 228-237.
- 124 Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in

- Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 2009; **30**: 142-157.
- 125 Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, *et al.* Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**: 313-339.
- 126 Guennoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Schumacher M. Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; **146**: 48-61.
- 127 Ono T, Imai Y. Effects of steroid hormones on synthesis of cholesterol in vitro. *J Biochem* 1971; **70**: 45-54.
- 128 Metherall JE, Waugh K, Li H. Progesterone inhibits cholesterol biosynthesis in cultured cells. Accumulation of cholesterol precursors. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2627-2633.
- 129 Metherall JE, Li H, Waugh K. Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2634-2640.
- 130 Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods Enzymol* 1996; **264**: 484-509.
- 131 Nagase M, Yamamoto Y, Mitsui J, Tsuji S. Simultaneous detection of reduced and oxidized forms of coenzyme Q10 in human cerebral spinal fluid as a potential marker of oxidative stress. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2018; **63**: 205-210.
- 132 Forsman U, Sjöberg M, Turunen M, Sindelar PJ. 4-Nitrobenzoate inhibits coenzyme Q biosynthesis in mammalian cell cultures. *Nat Chem Biol* 2010; **6**: 515-517.
- 133 Quinzii CM, Tadesse S, Naini A, Hirano M. Effects of inhibiting CoQ10 biosynthesis with 4-nitrobenzoate in human fibroblasts. *PLoS One* 2012; **7**: e30606.
- 134 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
- 135 Jin G, Kubo H, Kashiba M, *et al.* Saposin B is a human coenzyme q10-binding/transfer protein. *J Clin Biochem Nutr* 2008; **42**: 167-174.
- 136 Kashiba M, Terashima M, Sagawa T, Yoshimura S, Yamamoto Y. Prosaposin knockdown in Caco-2 cells decreases cellular levels of coenzyme Q10 and ATP, and results in the loss of tight junction barriers. *J Clin Biochem Nutr* 2017; **60**: 81-85.
- 137 Kashiba M, Oizumi M, Suzuki M, *et al.* Prosaposin regulates coenzyme Q10 levels in HepG2 cells, especially those in mitochondria. *J Clin Biochem Nutr* 2014; **55**: 85-89.
- 138 Takeuchi H, Sugawara K, Okamoto M, *et al.* Reduced prosaposin levels in HepG2 cells with long-term coenzyme Q10 deficiency. *J Clin Biochem Nutr* 2022; **71**: 97-102.
- 139 Zheng X, Boyer L, Jin M, *et al.* Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* 2016; **5**.

- 140 Agostini M, Romeo F, Inoue S, *et al.* Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell Death Differ* 2016; **23**: 1502-1514.
- 141 Esteban-Martínez L, Sierra-Filardi E, McGreal RS, *et al.* Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *Embo j* 2017; **36**: 1688-1706.
- 142 Martorana F, Gaglio D, Bianco MR, *et al.* Differentiation by nerve growth factor (NGF) involves mechanisms of crosstalk between energy homeostasis and mitochondrial remodeling. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 391.
- 143 Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; **24**: 677-736.
- 144 Sampath D, Jackson GR, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR. Effects of nerve growth factor on glutathione peroxidase and catalase in PC12 cells. *J Neurochem* 1994; **62**: 2476-2479.
- 145 Pan Z, Perez-Polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J Neurochem* 1993; **61**: 1713-1721.
- 146 Abe T, Kato M, Miki H, Takenawa T, Endo T. Small GTPase Tc10 and its homologue RhoT induce N-WASP-mediated long process formation and neurite outgrowth. *J Cell Sci* 2003; **116**: 155-168.
- 147 Kishida S, Yamamoto H, Kikuchi A. Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 4487-4501.
- 148 Lohman DC, Forouhar F, Beebe ET, *et al.* Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**: E4697-4705.
- 149 Altman J, Das GD. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. *Nature* 1967; **214**: 1098-1101.
- 150 Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; **4**: 1313-1317.
- 151 Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 2011; **14**: 2013-2054.
- 152 de Frutos F, Gea A, Hernandez-Estefania R, Rabago G. Prophylactic treatment with coenzyme Q10 in patients undergoing cardiac surgery: could an antioxidant reduce complications? A systematic review and meta-analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015; **20**: 254-259.
- 153 Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, *et al.* Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013; **30**: 1147-1156.
- 154 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; **343**: 425-430.
- 155 Goldstein JL, Rawson RB, Brown MS. Mutant mammalian cells as tools to delineate the

- sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* 2002; **397**: 139-148.
- 156 Schulz JG, Bösel J, Stoeckel M, Megow D, Dirnagl U, Endres M. HMG-CoA reductase inhibition causes neurite loss by interfering with geranylgeranylpyrophosphate synthesis. *J Neurochem* 2004; **89**: 24-32.
- 157 Zhang M, Wu J, Ding H, Wu W, Xiao G. Progesterone Provides the Pleiotropic Neuroprotective Effect on Traumatic Brain Injury Through the Nrf2/ARE Signaling Pathway. *Neurocrit Care* 2017; **26**: 292-300.
- 158 Vedder H, Anthes N, Stumm G, Würz C, Behl C, Krieg JC. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. *J Neurochem* 1999; **72**: 2531-2538.
- 159 Hodyl NA, Stark MJ, Meyer EJ, Lewis JG, Torpy DJ, Nenke MA. High binding site occupancy of corticosteroid-binding globulin by progesterone increases fetal free cortisol concentrations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2020; **251**: 129-135.
- 160 Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *J Endocrinol* 2016; **230**: R13-25.
- 161 Richelson E. Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115. *J Neurochem* 1973; **21**: 1139-1145.
- 162 Liu H, Nowak R, Chao W, Bloch KD. Nerve growth factor induces anti-apoptotic heme oxygenase-1 in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Neurochem* 2003; **86**: 1553-1563.
- 163 Qian Y, Chen H, Pan T, *et al.* Autologous decellularized extracellular matrix promotes adipogenic differentiation of adipose derived stem cells in low serum culture system by regulating the ERK1/2-PPAR  $\gamma$  pathway. *Adipocyte* 2021; **10**: 174-188.
- 164 Møller N, Gormsen L, Fuglsang J, Gjedsted J. Effects of ageing on insulin secretion and action. *Horm Res* 2003; **60**: 102-104.
- 165 Couet C, Delarue J, Constans T, Lamisse F. Age-related insulin resistance: a review. *Horm Res* 1992; **38**: 46-50.
- 166 Elahi D, Muller DC, McAloon-Dyke M, Tobin JD, Andres R. The effect of age on insulin response and glucose utilization during four hyperglycemic plateaus. *Exp Gerontol* 1993; **28**: 393-409.
- 167 Prior JC. Perimenopause: the complex endocrinology of the menopausal transition. *Endocr Rev* 1998; **19**: 397-428.
- 168 Moos T, Oates PS, Morgan EH. Expression of the neuronal transferrin receptor is age dependent and susceptible to iron deficiency. *J Comp Neurol* 1998; **398**: 420-430.

## 業績

### 本博士論文を構成する論文

1. Akari Nakamura et al. Cellular level of coenzyme Q increases with neuronal differentiation, playing an important role in neural elongations. J Clin Biochem Nutr. 2022 Sep;71(2):89-96.
2. Akari Nakamura et al. Transferrin, insulin, and progesterone modulate intracellular concentrations of coenzyme Q and cholesterol, products of the mevalonate pathway, in undifferentiated PC12 cells. J Clin Biochem Nutr. 2023 Jan. in press.

### 本博士論文に関連した学会発表

#### Narrated Communication

1. Akari Nakamura et al. Increased cellular level of Coenzyme Q10 during the differentiation of neuronal cells. 20th Biennial Meeting of SFRR International, Online Congress, March 15<sup>th</sup> -18<sup>th</sup> 2021 (Peer-reviewed)  
It won SFRR Asia 2021 Youth Investigator Award.

#### 口頭発表

1. 中村 朱里 et al. 神経細胞の分化に伴う細胞内コエンザイム Q 量の変化. 第 34 回日本酸化ストレス学会 関東支部会. オンライン開催. 2021 年 12 月 18 日.

#### ポスター発表

1. 中村 朱里 et al. PC-12 細胞の分化による細胞内コエンザイム Q 量の変化. 第 72 回日本酸化ストレス学会. 北海道. 2019 年 6 月.
2. 中村 朱里 et al. PC-12 細胞の分化とコエンザイム Q. 第 92 回日本生化学会大会. 神奈川. 2019 年 9 月 18 日- 20 日.
3. 中村朱里 et al. 神経ステロイド類は, PC12 細胞のコエンザイム Q (CoQ) 量を増加させる. 第 95 回日本生化学会大会. 2022 年 11 月 9 日-11 日.
4. Akari Nakamura et al. Administration of transferrin, insulin and progesterone increases cellular coenzyme Q levels in PC12 cells. 30th Meeting of SFRR Australasia & 10th Joint Meeting with SFRR Japan. Christchurch New Zealand. December 5<sup>th</sup> - 7<sup>th</sup> 2022.  
It won SFRR Japan Young Investigator Award 2022.

## 謝辞

本論文は東京工科大学応用生物学部応用生物学科及び東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻の課程に在籍中の研究結果をまとめたものである。

本研究を進めるにあたり、多くの方々に大変なお世話になりましたので、ここで深く御礼申し上げます。

まず、研究の実施において、終始丁寧なご指導と、ご鞭撻を賜りました加柴 美里 教授に心から、多大なる感謝を申し上げます。

また、研究成果に対する数々のアドバイスをいただいた山本 順寛 教授に御礼申し上げます。実験機器のメンテナンス等をしていただきました藤沢 章雄 教授に感謝申し上げます。

杉山 友康 教授には副査として助言を頂き、またティーチングアシスタントとしてもお世話になりました。心から御礼申し上げます。

副査として助言を頂くとともに、本論文の細部にわたりご指導賜りました、佐藤 淳 教授に感謝の意を表します。

副査として助言を頂くとともに、本論文の細部にわたり丁寧なご指導いただきました、岡田 麻衣子 助教に感謝の意を表します。

東海大学の竹腰 進 教授、北谷 佳那恵 先生には、PC12 細胞、N1E-115 細胞の細胞や試薬、培養方法の指導等を賜りましたこと、ここに深謝の意を表します。

そして本研究を行うにあたり、実験を手伝ってくださった同研究室の先輩方、後輩達に厚く御礼申し上げます。

2023 年 中村 朱里